

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS
VEGETAIS DAS ESPÉCIES *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*,
Schinus terebinthifolius, *Capsicum annuum*, E DE ANÁLOGOS
SINTÉTICOS DA CAPSAICINA, FRENTE AOS MICRORGANISMOS
DA CAVIDADE ORAL

MOEMA MOCAIBER PERALVA DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
DEZEMBRO- 2010

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS
VEGETAIS DAS ESPÉCIES *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*,
Schinus terebinthifolius, *Capsicum annuum*, E DE ANÁLOGOS
SINTÉTICOS DA CAPSAICINA, FRENTE AOS MICRORGANISMOS
DA CAVIDADE ORAL

MOEMA MOCAIBER PERALVA DOS SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Ciências
e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Ivo José Curcino Vieira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO- 2010

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATOS
VEGETAIS DAS ESPÉCIES *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*,
Schinus terebinthifolius, *Capsicum annuum*, E DE ANÁLOGOS
SINTÉTICOS DA CAPSAICINA, FRENTE AOS MICRORGANISMOS
DA CAVIDADE ORAL

MOEMA MOCAIBER PERALVA DOS SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 10 de dezembro de 2010

Comissão Examinadora:

Prof. Olney Vieira da Motta – (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF-RJ

Prof^a. Lanamar de Almeida Carlos (Doutora, Produção Vegetal) – UFSJ-MG

Prof. Cláudio Luiz Melo de Souza (Doutor, Produção Vegetal) – ISTCA/FAETEC

Prof. Ivo José Curcino Vieira (Doutor, Ciências) - UENF
Orientador

“...em paz com a vida, e o que ela me traz,
na fé que me faz otimista demais
se chorei ou se sorri, o importante é que
EMOÇÕES EU VIVI”

(*Emoções*, Roberto e Erasmo Carlos)

OFEREÇO

Aos meus pais Manoel (in memorian) e Maria Enid

DEDICO

Ao meu esposo Paulo e a meus filhos Paulinho e Nina.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar possível a vida;

A Nossa Senhora, por todas as vezes que intercede por mim junto a Jesus;

Aos meus filhos, Paulinho e Nina, por serem o meu maior sonho de amor realizado, a minha grande razão de viver;

Ao meu marido, Paulo, pelo companheirismo e incentivo não me deixando esmorecer nunca;

À minha mãe, Maria Enid por ser presença constante em minha vida;

Aos meus irmãos, que se mantiveram sempre ao meu lado nas horas difíceis;

Ao professor Ivo José Curcino Vieira, pela valiosa orientação, consideração e amizade demonstradas durante o curso;

Ao professor Olney da Motta, pela incessante colaboração, dedicação, amizade e incentivo durante esta caminhada;

Ao professor Cláudio Luiz Melo de Souza, pela compreensão, amizade, dedicação e colaboração, com que me auxiliou na finalização deste trabalho;

Aos professores Silvério de Paiva Freitas e Edmilson José Maria pela importante colaboração na minha qualificação;

Ao professor Antônio Carlos Perez da Silva por estar sempre presente no meu aprendizado;

À professora Janie Jasmim pela amizade e paciência nas horas difíceis;

À professora Rosana Rodrigues pela valiosa cooperação;

Aos demais professores do CCTA, CBB, CCT e CCH da UENF por toda a bagagem profissional que me ofereceram;

Aos técnicos e funcionários da UENF pela colaboração na realização dos trabalhos elaborados, em especial às colegas Patrícia, Luciana e Fatinha pelo carinho demonstrado;

A Gina e Lourdes, pela dedicação, carinho e apoio no decorrer deste trabalho;

A todos os colegas e amigos dos Laboratórios: LCQUI, LSA, LTA, LFIT, LSOL, LMGV, LPP, LEAG, LEEL pelo apoio e amizade externados durante a realização deste ideal;

À colega Natália Bernardes, pelas dicas e socorro nas horas difíceis;

Aos colegas do Instituto Superior de Tecnologia em Ciências Agrárias, pelo carinho com que me acolheram;

À amiga Verônica Moraes, que com seu carinho e serenidade, tornou mais suave e alegre esta trajetória;

Às amigas Elaine, Sílvia e Lanamar, porque serão para sempre;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), CNPQ e FAPERJ pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ESQUEMAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Família Anacardiaceae.....	3
3.1.1. <i>Mangifera indica</i> L.....	3
3.1.2. Estudos fitoquímicos da espécie <i>Mangifera indica</i>	6
3.1.3. <i>Schinus terebinthifolius</i>	7
3.1.4. Estudos Fitoquímicos da espécie <i>Schinus terebinthifolius</i> (Benson et al, 2000).....	8
3.2. Família Myrtaceae.....	9
3.2.1. <i>Eugenia jambolana</i>	9
3.2.2. Estudos fitoquímicos de <i>E. jambolana</i>	10
3.3. Família Solanaceae.....	11
3.3.1. <i>Capsicum annuum</i>	11

3.3.2. Estudo Fitoquímico da espécie <i>Capsicum</i> <i>annuum</i>	12
3.4. <i>Streptococcus mutans</i>	14
3.5. Biofilme.....	16
3.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
3.7. <i>Enterococcus faecalis</i>	21
3.8. <i>Escherichia coli</i>	22
3.9. <i>Candida albicans</i>	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Materiais.....	25
4.1.1. Vidrarias.....	25
4.1.2. Equipamentos.....	25
4.1.3. Outros materiais.....	26
4.1.4. Microrganismos testados.....	27
4.1.5. Espécies vegetais e substâncias padrão e sintetizadas utilizadas..	27
4.2. Metodologia.....	28
4.2.1. A escolha das plantas estudadas e coleta.....	28
4.2.2. A escolha das substâncias sintéticas estudadas.....	28
4.3. Secagem e moagem do material.....	28
4.4. Preparação dos extratos brutos vegetais.....	29
4.5. Isolamento das substâncias bioativas dos extratos em diclorometano e acetato de etila dos frutos de <i>Capsicum annuum</i> frente às cepas de <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>	29
4.6. Síntese dos derivados da capsaicina.....	31
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das <i>Mangifera indica</i> , <i>Eugenia jambolana</i> , <i>Schinus terebinthifolius</i> , <i>Capsicum annuum</i> L. substâncias isoladas e derivados sintéticos da capsaicina frente às cepas de <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida albicans</i>	31
4.7.1. Método de Difusão em ágar para Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	32
4.7.2. Método de diluição em meio líquido para avaliação da Concentração Mínima Inibitória.....	33

4.7.3. Preparo do inóculo.....	33
4.7.4. O teste de atividade das substâncias purificadas em cepas padronizadas de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i>	34
4.8. Análises estatísticas.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estudo cromatográfico do extrato (EP).....	30
Tabela 2.	Estudo cromatográfico da fração EP-7.....	30
Tabela 3.	Teste da concentração mínima inibitória do crescimento <i>in vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> sob aplicação do extrato de pimenta (<i>Capsicum annuum</i>), dihidroxicapsaicina, capsaicina e seus derivados sintéticos.....	38
Tabela 4.	Valores médios do halo (mm) de inibição do crescimento <i>in vitro</i> de microorganismos da cavidade oral sob aplicação do extrato de pimenta (<i>Capsicum annuum</i>), dihidroxicapsaicina, capsaicina e seus derivados sintéticos.....	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Média do halo de inibição (mm) do crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> para seleção de extratos vegetais com ação antimicrobiana.....	36
FIGURA 2.	Média do halo de inibição (mm) do crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> para os derivados sintéticos da capsaicina.....	37
FIGURA 3.	Média do halo de inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>P. aeruginosa</i> sob aplicação do extrato de pimenta (<i>C. annuum</i>), dihidroxicapsaicina, capsaicina e seus derivados sintéticos.....	43
FIGURA 4.	Média do halo de inibição do crescimento <i>in vitro</i> de <i>C. albicans</i> sob aplicação do extrato de pimenta (<i>Capsicum annuum</i>), dihidroxicapsaicina, capsaicina e seus derivados sintéticos.....	44

LISTA DE ESQUEMAS

- ESQUEMA 1.** Partição líquido-líquido (v/v) entre solventes imiscíveis dos frutos de *Capsicum annuum* e sementes de *Eugenia jambolana*..... 29

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

pH	Potencial hidrogeniônico
Reagente de Dragendorff	Solução de nitrato de bismuto básico II em ácido acético diluído com iodeto de potássio
ATCC	American Type Culture Colection
SA	Substância Análoga
EP	Extrato de Pimenta
DCAP	Dihidroxicapsaicina
CAP	Capsaicina

RESUMO

SANTOS, Moema Mocaiber Peralva dos; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Dezembro, 2010. Atividade Antimicrobiana *In Vitro* De Extratos Vegetais Das Espécies *Mangifera indica*, *Eugenia Jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annuum*, E De Análogos Sintéticos Da Capsaicina, Frente Aos Microrganismos Da Cavidade Oral. Orientador: Ivo José Curcino Vieira. Co-orientador: Olney Vieira da Motta.

A razão desse estudo foi determinar a ação antimicrobiana de análogos à capsaicina como novas drogas para doenças bucais, bem como oportunidade para a seleção de substâncias com maior ação antimicrobiana e menor ardor. O extrato de pimenta em acetato de etila, diclorometano e hexano, bem como diferentes substâncias naturais e sintéticas análogas à capsaicina foram testados sobre diferentes bactérias e *Candida albicans*, usando-se para avaliação da ação antimicrobiana o método de difusão em ágar e a concentração mínima inibitória foi obtida pelo método de diluição em meio líquido. Os microrganismos usados nesse estudo foram fornecidos pela FIOCRUZ-RJ e incluem *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. O antibiótico Gentamicina (10 µg/mL) foi utilizado como controle positivo nos bioensaios com bactérias e o nitrato de miconazol (50% v/v) como controle positivo nos bioensaios com o fungo *E. faecalis* e *E. coli* não foram inibidas por nenhum dos tratamentos utilizados. O *Streptococcus mutans* foi sensível ao extrato de pimenta apresentando um halo de inibição de 11,96 mm, bem como as substâncias dihidroxicapsaicina (15,30 mm), SA1 (16,20 mm), SA2

(19,20 mm) e SA4 (20,1 mm). A *P. aeruginosa* apresentou-se sensível pela quantificação do halo de inibição às substâncias: Capsaicina (11,77 mm), SA3 (10,10 mm) e SA4 (13,50 mm). O fungo, *C. albicans*, só apresentou sensibilidade à substância SA2 com halo de inibição de 9,55 mm. O extrato bruto de *C. annuum* em acetato de etila inibiu o crescimento de *S. mutans* na concentração mínima inibitória de 2,5 mg/mL. Quanto à fração que continha capsaicina e dihidroxicapsaicina (FRA) e os análogos sintéticos da capsaicina (SA2, SA3 e SA4) apresentaram concentração mínima inibitória de 2,5 µg/mL. Os dados apresentados demonstram o potencial antimicrobiano das substâncias testadas contra microrganismos patogênicos.

ABSTRACT

SANTOS, Moema Mocaiber Peralva dos; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. December, 2010. In vitro Antimicrobial activity of vegetal extracts of the species *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annum*, and of the synthetic analogs of Capsaicin, against of microorganisms of the oral cavity. Adviser: Ivo José Curcino Vieira. Co-adviser: Olney Vieira da Motta.

The rationale of this study was to determine the antimicrobial activity of synthetic analogs compounds of capsaicin like new drugs for oral diseases, as well as opportunity for selection of compounds with high antimicrobial activity and small ardor. Ethyl acetate, dichloromethane and hexane extracts from spice, and the compounds *in nature* and synthetics analogues to capsaicin were screened against different bacteria and *Candida albicans* using the agar diffusion method, and the extracts which showed positive antimicrobial activity were tested for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC). The microorganisms used in this study were provided by FIOCRUZ-RJ and included *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *C. albicans*. The antibiotic, Gentamicine (10 µg/mL) and the fungicide, miconazol nitrate (50% v/v), were used as positive controls to bacteria and fungi, respectively. *E. faecalis* e *E. coli* were found to be tolerant to all the extracts and synthetic analogs of capsaicin, at the concentrations tested. *S. mutans* showed to be susceptible to extract from *C. annum* tested in the present study, with zone of inhibition of 11,96 mm, as well as to the compounds dihydroxycapsaicin (15,30 mm), SA1 (16,20 mm), SA2 (19,20 mm) and SA4 (20,1 mm). When *Pseudomonas*

aeruginosa was exposed to the capsaicin, SA3 and SA4 were observed the zones of inhibition of 11,77; 10,10 and 13,50 mm, respectively, with discrete antibacterial activity. The strain of *C. albicans* did not show any inhibition when exposed to all treatments, except when used the compound SA2 (9,55 mm). Ethyl acetate extract from *C. annuum* inhibited the growth of all the bacteria tested in this study at concentration of 2,5 mg/mL. However, the extract's fraction containing capsaicin and dihydroxycapsaicin and the synthetic analogs (SA2, SA3 e SA4) presented minimum inhibitory concentration against *S. mutans* of 2,5 µg/mL. The data presented shown the antimicrobial potential of the compounds used against pathogenic microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins curativos e na prevenção de doenças é a forma mais antiga de prática medicinal da humanidade (Veiga Jr. et al., 2005). As plantas utilizadas na medicina tradicional constituem uma importante fonte de novas substâncias biologicamente ativas, e são utilizadas em muitas partes do mundo ao longo de décadas (Belém, 2002; Michelin, 2005), com grande relevância nos países em desenvolvimento (Silva et al., 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, (OMS), a maior fonte de fármacos da humanidade é oriunda de espécies vegetais (França et al., 1993; Moreira, 2002).

Para o estudo das plantas medicinais existem quatro tipos básicos de abordagem:

- a) A randômica, na qual a coleta de plantas é aleatória para estudos fitoquímicos e farmacológicos (Calderón, 2000);
- b) A quimiotaxonômica ou filogenética, que consiste na seleção de plantas de uma determinada família ou gênero, que se tenha

conhecimento de ao menos uma espécie do grupo (Silva e Cechinel, 2002);

c) A ecológica, que se baseia no comportamento animal em ingerir plantas não para matar sua fome, mas para combater ou controlar doenças, (Huffman, 2003);

d) A etnorientada, que consiste na seleção de medicamentos, de acordo com seu uso popular (Maciel et al., 2002).

Com a promulgação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, o uso de plantas medicinais no Brasil vem crescendo e se consolidando nos últimos tempos (Brasil, 2004).

Segundo Silva e Casali (2000), dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que mais da metade dos habitantes da terra em especial os dos países pobres, e em desenvolvimento utilizam alguma planta medicinal para alívio ou cura de determinadas enfermidades, sendo que 30% dessas indicações são com receita médica.

No Brasil 25% dos produtos fabricados nas indústrias de medicamentos e cosméticos, contêm algum princípio ativo natural (Silva Jr. et al., 2006).

A importância medicinal, econômica e ecológica de espécies nativas brasileiras e sua exploração indiscriminada pelo homem, têm motivado o estudo dessas plantas visando protegê-las também da extinção (Martins, 2006).

Os avanços terapêuticos em torno de plantas medicinais cresceram na proporção de 50% para os medicamentos utilizados de origem sintética, 25% são provenientes de plantas, isolados diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal, e os outros 25% restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais (marinhos, microbiológicos, entre outros) (Calixto, 2000).

Na odontologia, o uso das plantas medicinais não é tão restrito quanto se pensava. Hoje existem plantas usadas com efetividade comprovada no serviço público e privado há mais de quinze anos. Para os cirurgiões dentistas, o que falta hoje, são textos ou pesquisas relacionados ao assunto, tornando-os céticos em relação à eficácia dos fitomedicamentos (Pinheiro, 2008).

O Brasil possui um grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia aplicada na odontologia, já que apresenta a maior biodiversidade vegetal do mundo, uma ampla sociodiversidade com o uso de plantas medicinais vinculado

ao conhecimento tradicional, e tecnologia para avaliar cientificamente este conhecimento (Martins, 2000; Albuquerque e Hanazaki, 2006).

Um avanço neste ramo da ciência deverá permitir uma seleção de espécies vegetais para uso na odontologia, contribuindo assim para o direcionamento de pesquisa nesta área, e o desenvolvimento de fitoterápicos de qualidade e validados para uso odontológico, bem como permitir a divulgação destes estudos para a população e profissionais afins (Oliveira, 2007).

Neste trabalho foram selecionadas quatro espécies vegetais para investigação microbiológica, baseando-se em informações populares e científicas de seus usos na odontologia, e alguns derivados sintéticos da substância capsaicina (isolada de *Capsicum annuum*), para verificação da atividade antimicrobiana. As espécies selecionadas foram *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), árvore de frutos aromáticos, adocicados, brilhantes e de cor vermelha. Também é conhecida como aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-do-sertão, aroeira pimenteira (Lorenzi e Matos, 2002).

Capsicum annuum (Solanaceae), cujos frutos são as pimentas e os pimentões (Segato, 2007).

Mangifera indica (Anacardiaceae), cujos frutos são conhecidos como manga (Souza, 2005).

Eugenia jambolana (Sinonímia: *Syzygium cumini*), Myrtaceae, cujos frutos são conhecidos como, jamelão, jambolão, ou azeitona (Souza, 2005).

Nos ensaios antimicrobianos foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans*, (ATCC 25175), *Candida albicans* (ATCC 36801), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtidas das coleções da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ) e estocadas na bacterioteca do Laboratório de Sanidade Animal do CCTA – UENF.

2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais e ou substâncias puras das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana* (Syn. *Syzygium cumini*), *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annum*, e alguns derivados sintéticos da substância capsaicina (isolada de *Capsicum annum*), frente aos microorganismos *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, obtidos das coleções do Laboratório de sanidade Animal da UENF.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae é uma das maiores da ordem das Sapindales, e compreende de 70 a 80 gêneros, com cerca de 600 espécies pantropicais em sua maior parte, com pequena distribuição nas regiões temperadas (Barroso, 1991). Apresentam folhas inteiras ou compostas, de disposição alterna, com pequenas flores brancas, ou amarelo-esverdeadas (Joly, 1991).

São arbustos ou árvores, raramente lianas ou ervas aromáticas. Diversas delas apresentam frutos ou pseudofrutos comestíveis, podendo também ser utilizadas na ornamentação de ruas e praças (Souza, 2005).

3.1.1. *Mangifera indica* L.

Mangifera indica L. (mangueira), família Anacardiaceae, é originária da Ásia meridional e do Arquipélago Indiano, onde é cultivada há mais de 4000 anos (Simão, 1998).

Foi trazida para o Brasil pelos portugueses, que a introduziram primeiro na Bahia, onde se generalizou rapidamente (Gomes, 1973).

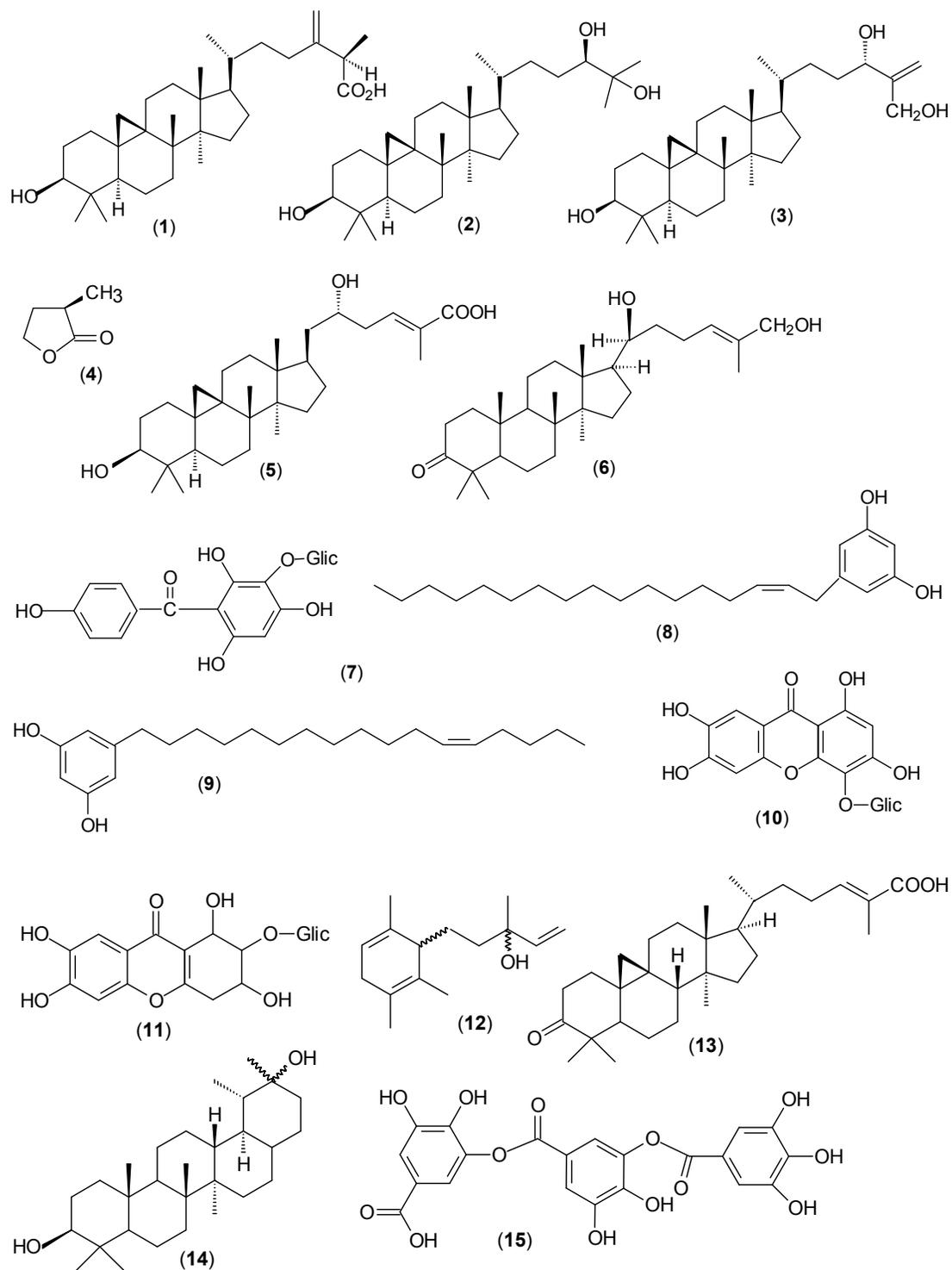
É difundida em todo o país, menos nas regiões do extremo sul, ou de grandes altitudes, e de um modo geral prospera em todas as regiões equatoriais, tropicais, subtropicais, não tolerando assim excesso de frio. Estudos feitos em Porto Rico identificaram alguns componentes desta fruta responsáveis pelo seu aroma, dentre eles: alcoóis, aldeídos, cetonas e terpenos (Maranca, 1983).

A Manga, fruto da *Mangifera indica* L. é fonte de caroteno (precursor da vitamina A), e a fumaça de suas folhas queimadas, segundo alguns autores, pode atuar contra soluços e afecções da garganta (Manica, 1981).

Segundo Panizza, (1997), as partes mais usadas desta planta com fins terapêuticos são folhas, frutos e cascas dos ramos, tendo indicação para afecções pulmonares, gengivas inflamadas e úlceras de decúbito.

3.1.2. Estudos fitoquímicos da espécie *Mangifera indica*

Da espécie *Mangifera indica* foram isoladas as seguintes substâncias: ácido ambólico (1), cicloartano-3,24,25-triol (2), cicloart-25-en-3,24,27-triol-9,19-ciclolanost-25-en-3,24,27-triol (3), dihidro-3-metil-2-(3H)-furanona, α -metil- γ -butirolactona (4), ácido dihidroxícicloart-24-en-26-óico (5), dihidroxi-24-dammaren-3-ona-3-ceto-24-dammareno-20,26-diol (6), glucosil-2,4',6-tetrahidroxibenzofenona (7), (2-heptadecenila) resorcinol (8), (12-heptadecenila)-1,3-benzenodiol (9), isomangiferina (10), mangiferina (11), metil-5-(2,3,6-trimetil-2,5-cicloexadienila)-1-penten-3-ol (12), ácido oxocicloart-24-en-26-óico (ácido mangiferônico) (13), taraxastanediol (14), ácido *m*-trigálico (15).

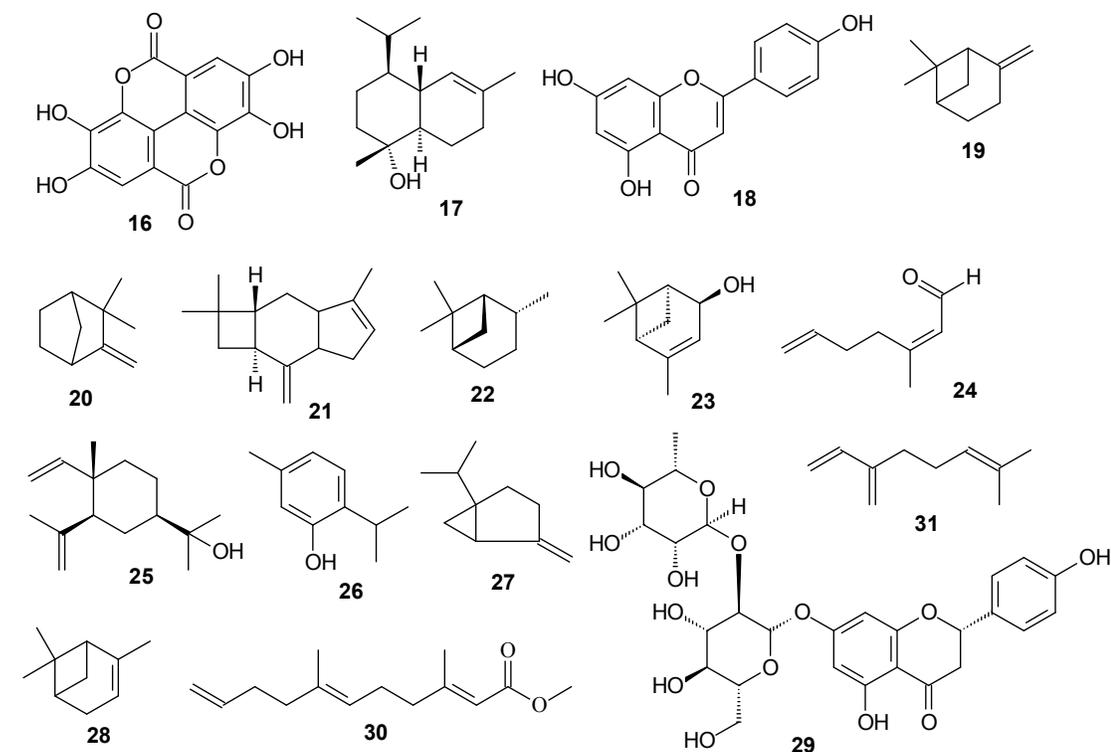


3.1.3. *Schinus terebinthifolius*

Schinus terebinthifolius (aroeira, pimenta rosa), família Anacardiaceae, nativa da caatinga e do cerrado, desde o Ceará até o Paraná é uma árvore mediana, que fornece madeira para lenha e carvão, sendo também muito utilizada para fins medicinais no tratamento de afecções urinárias, doenças do aparelho respiratório, bem como no caso de hemoptise e hemorragia uterina (Lorenzi e Matos, 2002).

3.1.4. Estudos Fitoquímicos da espécie *Schinus terebinthifolius* (Benson et al., 2000)

De *Schinus terebinthifolius* foram isoladas as seguintes substâncias: ácido ellágico (**16**), (1*R*,4*S*,4*aR*,8*aR*)-1,2,3,4,4*a*,7,8,8*a*-octahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-1-naftalenol (**17**), 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4*H*-1-benzopiran-4-ona (**18**), 6,6-dimetil-2-metilenobicycloheptano (**19**), 2,2-dimetil-3-metilenobicycloheptano (**20**) camfeno (**21**), *rel*-(1*R*,2*S*,5*R*)-2,6,6-trimetilbicycloheptano (**22**), *rel*-(1*R*,2*R*,5*R*)-4,6,6-trimetilbicyclohept-3-en-2-ol (**23**), (2*Z*)-3,7-dimetil-2,6-octadienal (**24**), (1*R*,3*S*,4*S*)-4-etenil-4-trimetil-3-(1-metiletenil)-ciclohexanometanol (**25**), 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol (**26**), 4-metileno-1-(1-metiletil)-bicyclohexano (**27**) α -pineno (**28**), naringina (**29**), éster metílico do ácido 3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienóico (**30**), 7-metil-3-metileno-1,6-octadieno (**31**).



3.2. Família Myrtaceae

A família Myrtaceae, possui cerca de 100 gêneros com aproximadamente 3.000 espécies, com grandes pontos de dispersão nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo mundo (Souza, 2005).

São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas alternas e flores geralmente brancas. Das espécies freqüentes no Brasil, destaca-se o Jamelão ou Jambolão, freqüente no litoral, com floração na primavera (Joly, 1991).

Na flora brasileira, as plantas da família Myrtaceae estão entre as mais comuns na maioria das formações vegetais, com destaque para a Floresta Atlântica e para a Restinga, onde o gênero *Eugenia*, e outros são muito comuns representando a família com maior número de espécies (Souza, 2005).

3.2.1. *Eugenia jambolana*

Eugenia jambolana, família Myrtaceae, conhecida popularmente como jamelão é uma planta com origem na Índia. É uma árvore que pode atingir 10 metros de altura e possui flores e frutos pequenos e arroxeados quando maduros.

É uma árvore perenifólia, de tronco com casca rugosa, de cor pardo acinzentada depois pardo escuro, de ramagem numerosa formando copa arredondada e densa, que aprecia o calor e solos úmidos, tornando-se subespontânea em muitas regiões (Lorenzi et al., 2003).

O gênero *Eugenia* é considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com aproximadamente 500 espécies de árvores e arbustos, com cerca de 400 distribuídos pelo Brasil (De Oliveira, 2005) e figura entre os mais importantes na família Myrtaceae, com espécies de valor comercial, nutritivo e potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos (Donadio, 1997; Silva et al., 2003).

Eugenia jambolana, pode ser utilizada em programas de reflorestamento e em áreas urbanas e seus frutos apresentam potencialidade de uso industrial (Silva, 2005).

Este gênero assume uma posição especial, por fornecer extratos utilizados na medicina tradicional como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios (Hussein et al., 2003), antidiabéticos (Pepato, 2001; Sridhar, 2005), nas arritmias e insuficiência cardíaca (Vendruscolo, 2005).

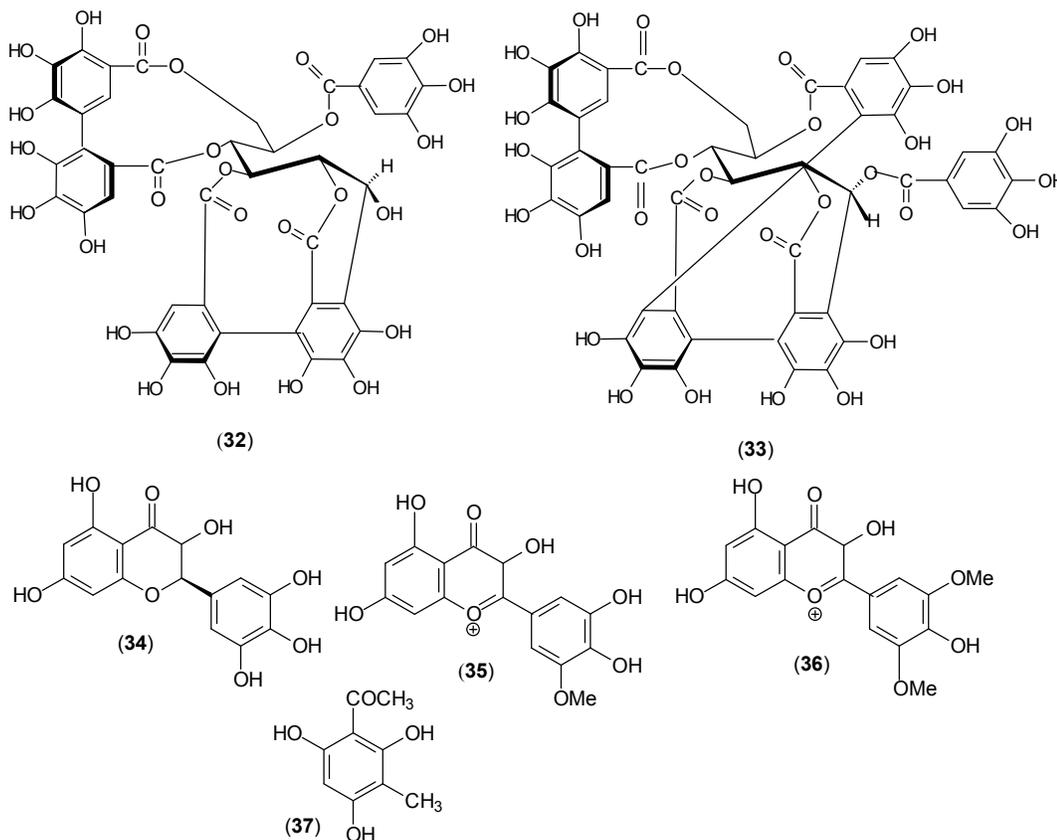
Informações farmacológicas incluem o uso das cascas desta planta como medicação no tratamento de hemorragias, leucorréia, disenteria e o pó de suas sementes tem efeito hipoglicemiante para o controle da diabetes (Agostini et al., 2008).

É uma planta pouco estudada do ponto de vista químico, com registros na literatura da presença nos frutos de amido, tanino, ácido gálico e resina fenólica. Também foram encontradas gorduras derivadas de ácidos graxos insaturados, fitosterol, ácido cinâmico, quercitina e um glicosídeo chamado antimelina (Matos, 2002).

3.2.2. Estudos fitoquímicos de *E. jambolana*

Estudos fitoquímicos desta planta indicaram as seguintes substâncias: 1-O-galoil castalagina (**32**), casuarinina (**33**), 3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona (**34**),

3,3',4',5,7-pentahidroxi-5'-metoxiflavilium (35), 3,4',5,7-tetrahidroxiflavilium (36), 2',4',6'-trihidroxi-3'-metilcetofenona (37).



3.3. Família Solanaceae

A família Solanaceae ocorre em diversas partes do mundo, e tem como centro de diversidade a América do Sul, com 31 gêneros e cerca de 500 espécies nativas (Hunziker, 2001). Destes, 23 gêneros e aproximadamente 180 espécies nativas (Stehmann e Mentez, 2006) fazem parte da flora da região sul do Brasil.

São plantas arbóreas, arbustos, e seus frutos são do tipo baga, drupa ou cápsula (Dallwitz e Watson, 1992).

Possui grande relevância econômica, com espécies cultivadas para a alimentação, como plantas ornamentais, medicinais e importância farmacológica. Apresentam alcalóides esteroidais, os quais são empregados na síntese de hormônios e esteróides (Agra e Bhattacharyya, 1999; Silva et al., 2005).

3.3.1. *Capsicum annuum*

Pimentas do gênero *Capsicum* pertencem à ordem Solanales, família Solanaceae (Moreira et al., 2006).

As pimentas são um importante segmento no setor de hortaliças, tanto para a agricultura, quanto para a indústria alimentícia, sendo especiais para a produção de condimentos devido à cor de seus frutos e aos seus princípios ativos, que lhes conferem aroma e sabor (Moreira et al., 2006).

Os frutos de *Capsicum* são consumidos *in natura* ou processados para utilização na indústria farmacêutica para a composição de remédios e ainda na indústria bélica (aerossol de pimenta). A principal característica do fruto de pimenta é a pungência, que lhe é dada por substâncias nitrogenadas denominadas capsaicinóides, que são produzidos em glândulas presentes na placenta dos frutos (Wagner, 2003).

No Brasil, as pimentas estão difundidas em todas as regiões, mas as principais produtoras são as regiões Sudeste e Centro-Oeste, sendo a espécie *Capsicum annuum*, cultivada, principalmente em São Paulo, Minas Gerais e Goiás (Pinto et al., 2006).

A espécie *Capsicum annuum*, destaca-se como uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo (Reifschneider, 2000), apresentando uma produção mundial de 650.763,397 toneladas/ano (FAO, 2003).

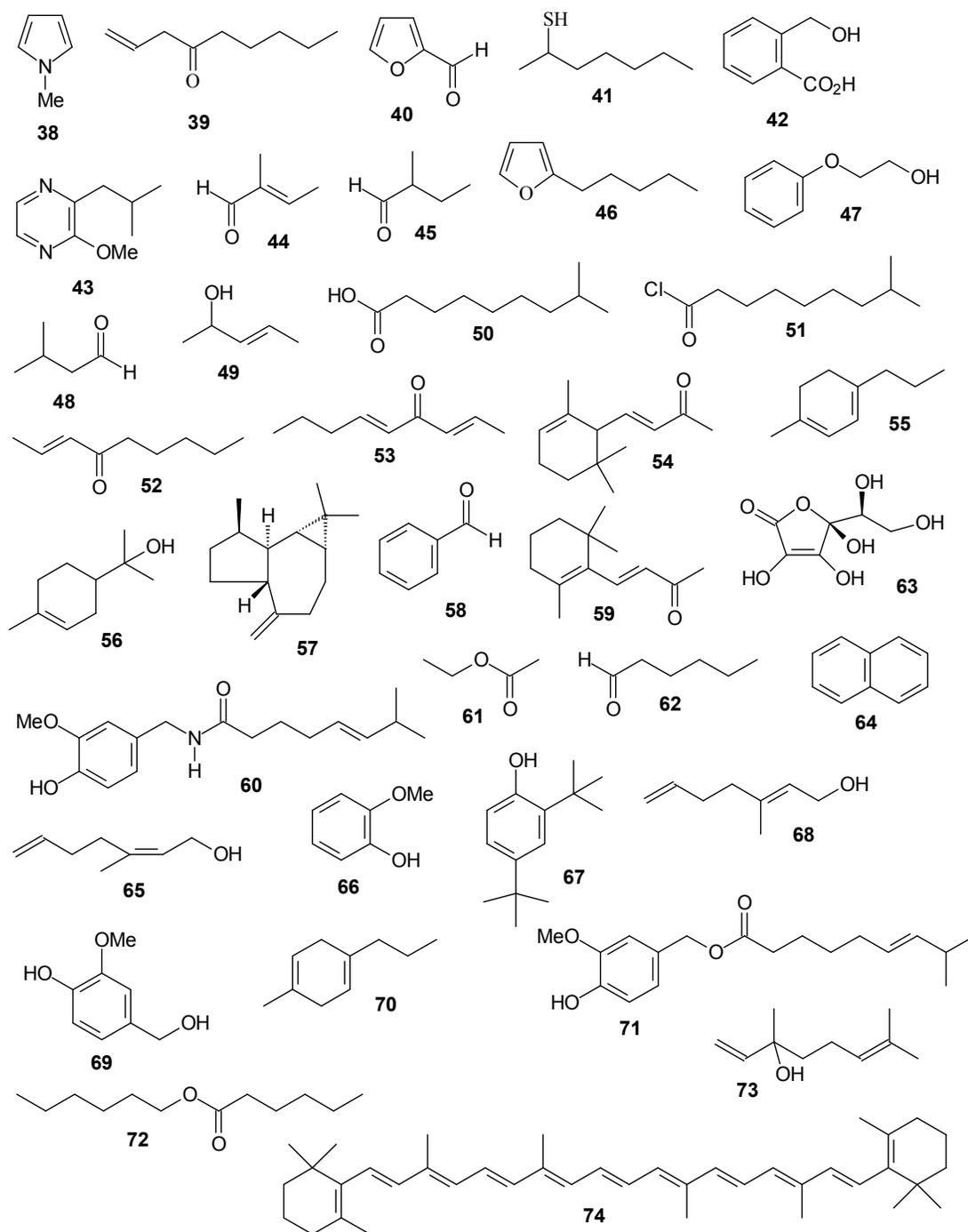
Esta hortaliça merece destaque ainda pela sua alta qualidade nutricional, e seu alto conteúdo de vitamina C (Bonetti, 2002).

Além dos frutos de sabor picante, há também frutos doces, utilizados na fabricação da páprica (Vidigal, 2008).

3.3.2. Estudo Fitoquímico da espécie *Capsicum annuum*

De *Capsicum annuum* foram isoladas as seguintes substâncias, 1-metil-1H-pirrol (**38**), 1-nonen-4-ona (**39**), 2-furancarboxaldeído (**40**), 2-eptanetriol (**41**), 2-(hidroximetil)-ácido benzóico (**42**), 2-metoxi-3-(2-metilpropil)-pirazina (**43**), 2-metil-2-butenal (**44**), 2-metilbutanal (**45**), 2-pentilfurano (**46**), 2-fenoxietanol (**47**), 3-metilbutanal (**48**), 3-penten-2-ol (**49**), ácido 8-metilnonanóico, (**50**), cloreto de 8-metilnonanoila (**51**), (2E)-2-nonen-4-ona (**52**), (2E,5E)-2,5-nonadien-4-ona (**53**), (3E)-4-(2,6,6-trimetil-2-cicloexen-1-ila)-3-buten-2-ona (**54**), 1-metil-4-(1-metiletil)-1,3-cicloexadieno (**55**), (4-metil-cicloex-3-eno)-metiletanol (**56**),

(1aR,4aR,7R,7aR,7bS)-decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-1*H*-ciclopropazuleno (**57**), benzaldeído (**58**), (3*E*)-4-(2,6,6-trimetil-1-cicloexen-1-ila)-3-buten-2-ona (**59**), (6*E*)-*N*-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metil-6-nonenamida (**60**), éster etílico do ácido acético (**61**), hexanal (**62**), ácido ascórbico (**63**), naftaleno (**64**), (2*Z*)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (**65**), 2-metoxifenol (**66**), 2,4-*bis*-(1,1-dimetiletil)-fenol (**67**), (2*E*)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (**68**), 4-hidroxi-3-metoxibenzenometanol (**69**), 1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno (**70**), (6*E*)-éster metílico do (4-hidroxi-3-metoxifenil)-8-metil ácido 6-nonenóico (**71**), éster hexílico do ácido hexanóico (**72**), 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (**73**), betacaroteno (**74**).



3.4. *Streptococcus mutans*

Numerosos sítios ecológicos compõem a cavidade oral, epitélios, dentes, próteses, saliva e líquido gengival (Ponton, 2000), e é onde se hospeda grande quantidade e variedade de microrganismos (Uzêda, 2002). A flora faríngea é semelhante à oral e nas fossas nasais predominam *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., formando assim estes três sítios as vias aéreas superiores (Trabulsi et al., 1999).

Cerca de 1000 espécies de microrganismos já foram isoladas e identificadas nessa região do organismo (Wilson, 2004).

Algumas destas espécies já foram identificadas como agentes causadores de uma variedade de doenças dentro e fora da cavidade bucal (Meyer e Fives-Taylor, 1998), embora esta microbiota quando se encontra em uma situação de equilíbrio com o hospedeiro, contribui para que o sistema imunológico do indivíduo fique balanceado (Barbieri et al., 2007).

Segundo Coelho et al. (2008), sendo a cavidade bucal um sistema de crescimento aberto, ela aloja uma grande variedade de microrganismos que são repetidamente introduzidos e removidos deste sistema, se estabelecendo somente aqueles que possuem capacidade de aderência às superfícies, ou que fiquem retidos de alguma maneira.

Destacam-se dentre estes microrganismos, (cerca de 400 espécies), gêneros como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacterioides*, *Actinomyces*, *Treponema*, *Mycoplasma* (Trabulsi et al., 1999), além de protozoários, fungos-e vírus (Kazor et al., 2003).

A microbiota oral tem grande importância em odontologia e medicina, pois a cárie dentária e as doenças do periodonto, actinomicoses e endocardites subagudas, são todas doenças causadas por membros da microbiota da cavidade oral (Trabulsi et al., 1999).

Do ponto de vista microbiológico, o aparecimento das lesões cariosas está diretamente ligado à presença de vários microrganismos, principalmente o *Streptococcus mutans*, os quais colonizam a superfície dos elementos dentários pouco depois que irrompem na cavidade oral (Kawashima et al., 2003; Sventer et al., 2003; Lindquist e Edmilson, 2004; Marsh, 2004; Seki, 2006).

A cárie dental é uma das doenças mais comuns do mundo, mas embora raramente seja uma ameaça à vida (Forssten, 2010), é muitas vezes associada com bacteremia e endocardite infecciosa (Nakano, 2008). É a destruição da estrutura do esmalte do dente, pelos ácidos produzidos pelo metabolismo de carboidratos pelas bactérias cariogênicas (Aksoy et al., 2006). Por isso, o hábito alimentar é um importante fator predisponente à infecção pelo *Streptococcus mutans* (Carvalho et al., 2006).

Sabe-se atualmente que um grande número de diferentes organismos induz cáries em animais-testes apropriados, e que alguns são seletivos em diferentes áreas da dentição. Linhagens de *Streptococcus mutans* parecem ser os mais versáteis dos organismos cariogênicos, tendo sido experimentalmente demonstrado como iniciadores de cáries em todas as superfícies de todos os dentes (Menaker, 1984), pois são os pioneiros na colonização inicial da superfície dentária (Gibbons e Hay, 1989).

Segundo Parini e Pitt (2006), estes microrganismos na cavidade oral, estão alojados nos dentes, gengiva, sulco peridontal, língua e bochechas.

Moreira et al. (2007), comprovaram em estudos recentes, que devido à alta variabilidade genética em isolados de cepas de *Streptococcus mutans*, existe transmissibilidade deste microrganismo entre indivíduos da mesma família.

Na realidade, corresponde a um complexo de microrganismos que possuem muitas características fenotípicas e genotípicas comuns e, portanto, eram classificadas como *Streptococcus mutans*. Todas as cepas desta espécie de microrganismo formam polissacarídeos extracelulares aderentes, a partir da sacarose, e polissacarídeos intracelulares (amilopectina) a partir de carboidratos fermentáveis e, com algumas exceções, fermentam manitol e sorbitol (Uzêda, 2002).

Entre os polissacarídeos extracelulares mais importantes sintetizados pelo *Streptococcus mutans* se destaca a dextrana, polímero da glicose. Esta é sintetizada pela bateria enzimática do *Streptococcus mutans*, e constitui uma macromolécula glicídica altamente aderente que contribui para as características adesivas da placa bacteriana (Brown, 1991).

Segundo Hamada (1975), esta bactéria produz mutacina, que é uma proteína, que interfere inibindo a capacidade de outras bactérias gram-positivas (*Streptococcus* ou não), de crescerem em um mesmo ambiente que estes

Streptococcus. A produção de mutacinas, ajuda aos *Streptococcus mutans*, a se estabelecerem e colonizarem a cavidade oral com eficiência (Rogers, 1976).

3.5. Biofilme

A habilidade dos *Streptococcus mutans* iniciarem a cárie depende de várias características bacterianas, inclusive de adesão às superfícies dentárias para formar a placa bacteriana (Charbeneau, 1978), e sua capacidade de formar biofilme. Este microrganismo tem sido considerado a principal bactéria envolvida na formação da placa bacteriana, sendo a superfície dentária seu único habitat natural conhecido até hoje (Canettieri, 2006).

O mecanismo de formação de biofilme é um processo biológico (Rozen, et al., 2001), e o *Streptococcus mutans* é uma bactéria que depende de biofilme para sobreviver e se manter viável em seu ecossistema natural (Li, 2000).

Os biofilmes formam-se sobre uma grande variedade de superfícies tais como dentes, epitélios, grãos de areia, cateteres, plásticos, aço inoxidável e outras, com diferentes espécies de microrganismos interagindo entre si e com o ambiente (Watinick, 2000).

As bactérias freqüentemente colonizam superfícies de organismos vivos ou matéria inanimada, aderindo-se-lhes firmemente, formando comunidades contendo membros de uma ou mais espécies microbianas. Tais comunidades são denominadas biofilmes, e nestes as populações e comunidades participantes são interdependentes funcionando, de forma complexa e coordenada, como um consórcio cooperativo (Dvey, 2000).

O processo de formação da placa bacteriana se divide em três fases. Na primeira fase, ocorre a formação da película adquirida do esmalte, que é a fase inicial, onde as superfícies da cavidade oral são cobertas por uma película de glicoproteína derivada de componentes salivares e do fluido gengival, bem como de produção de células bacterianas e dos tecidos do hospedeiro. Na segunda fase, ocorre a colonização inicial das superfícies dentárias, predominantemente por microrganismos facultativos gram-positivos. Essa placa amadurece, ocorrendo assim a transição do ambiente aeróbico para um meio altamente privado de oxigênio, prevalecendo assim as bactérias anaeróbicas. Na terceira fase, ocorre a colonização secundária e a maturação da placa, onde os

microrganismos que não se aderiram às superfícies limpas dos dentes, agora se aderem a células de bactérias que já estão na placa por um mecanismo conhecido como co- agregação (Marinho e Pereira, 1998).

Após a colonização inicial de bactérias na placa, ocorre o aumento da diversidade microbiana proporcionando a formação e acúmulo do biofilme dental, fator etiológico determinante da cárie dentária e da maioria das doenças bucais. Um dos fatores principais para o desenvolvimento do biofilme cariogênico é o acúmulo de *Streptococcus mutans* que leva à produção de ácidos proporcionando queda do pH salivar (Murata, 2004).

O mecanismo bacteriano do biofilme, na superfície dentária, se explica pela produção de ácidos orgânicos, que altera o equilíbrio iônico dessa área, resultando na perda de cálcio do esmalte para neutralizar o hidrogênio livre da saliva, provocando uma desmineralização da estrutura do esmalte dentário. Quando a saliva tem seu pH restabelecido ao normal, ela devolve o cálcio ao esmalte, havendo então uma remineralização do esmalte (Marta, 2002).

Pesquisas têm demonstrado que bactérias inseridas em um mesmo biofilme passam a exibir características fenotípicas distintas, o que resulta no aumento de sua resistência a agentes antimicrobianos (Evans e Homes, 1987).

Sendo assim, a formação de biofilme, é um importante mecanismo de adaptação da bactéria ao seu meio ambiente (Cvitkovitch et al., 2003). *Streptococcus mutans* é uma bactéria exposta a mudanças constantes em seu ambiente, como extremas faltas ou excessos de nutrientes, mudanças de pH, alta osmolaridade, oxidação, e consumo de agentes antimicrobianos pelo hospedeiro, representando um bom exemplo das forças envolvidas na manutenção da homeostase dos ecossistemas orais (Thurnheer et al., 2004).

Os biofilmes são de inquestionável importância para a sobrevivência de bactérias nos tratos bucal, vaginal e intestinal e a sua presença sobre a superfície dos dentes, cateteres e implantes plásticos, e instrumentos cirúrgicos, são causas de infecções hospitalares e outras doenças (Dvey, 2000).

Os biofilmes bacterianos são formados quando microrganismos unicelulares se tornam irreversivelmente aderidos a uma superfície sólida e envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares (Mah e O'Toole, 2001; Spratt e Pratten, 2003). A produção de ácidos pelas bactérias acidogênicas e

acidúricas no biofilme dental é pré-requisito essencial para o desenvolvimento das lesões de cárie (Bowden e Edwardsson, 1995).

Este mecanismo ácido tolerante do *Streptococcus mutans*, e de formação de biofilme por este microrganismo, é regulado por meio da ativação do sistema Quorum-Sensing (LI et al., 2002), ou seja, um mecanismo bacteriano para regulação da expressão genética em resposta a mudanças na densidade da população (Merritt, 2003).

Em muitas bactérias gram-positivas, o sistema de Quorum-Sensing consiste em um sinal regulatório entre dois componentes (bactérias), um sensor histidina quinase de membrana e um regulador de resposta intracelular (Cvitkovitch, 2003).

Para que este mecanismo de Quorum-Sensing seja desencadeado, é preciso a presença intra-espécies bacterianas de um gene chamado *luxS*, que é um peptídeo, sinalizador de quorum sensing (Merritt, 2002).

Segundo Yoshida (2004), em estudos recentes, foi constatada a utilização deste gene pelo *Streptococcus mutans* para formação do biofilme dentário.

Atualmente, a tentativa de inibir as atividades das glicosiltransferases é um das estratégias que visa ao controle da formação do biofilme dental cariogênico (Koo et al., 1999).

Em sua essência, a placa bacteriana corresponde a uma agregação de múltiplas bactérias ativas de diferentes espécies que se encontram imersas em uma matriz extracelular composta fundamentalmente de polissacarídeos. Este ecossistema microscópico se adere firmemente à superfície dos dentes, especialmente em zonas difíceis de higienizar (Tilstrup, 1988).

Estes microrganismos, cariogênicos por excelência, são encontrados em cerca de 90% das pessoas, são altamente acidogênicos e acidúricos, e o seu potencial cariogênico é bem estabelecido em animais (Baratieri, 1992).

Os *Streptococcus mutans* induzem cárie dentária em animais experimentais como hamsters, ratos e primatas sub-humanos. A infecção da superfície dentária com este microrganismo geralmente precede o desenvolvimento da cárie (Krasse, 1988).

Os *Streptococcus mutans* são cocos imóveis, gram-positivos, catalases negativos, que formam cadeias curtas ou médias, crescem em meio ágar *Mitis salivarius* em colônias altamente convexas, com consistência firme pulveriforme

(forma de almofada), e forma polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose. Suas colônias são opacas, sua superfície parece vidro esmerilhado. Sob condições anaeróbicas, seus requisitos nutricionais são mais simples. A morfologia da colônia é diversa e depende do meio de cultura. Em meio sólido, a colônia é rugosa, podendo se apresentar também nas formas lisas e mucóides (Newbrun, 1988).

Quando cultivadas em sacarose, formam polissacarídeos que são insolúveis, ou podem ser precipitados com uma parte de etanol. Os *Streptococcus mutans* não exigem vitaminas para o seu crescimento (Loesche, 1993).

O melhor meio seletivo para isolar o *Streptococcus mutans*, é o ágar *Mitis salivarius bacitracina* que contém 20% de sacarose e 0,2 unidades/mL de bacitracina, o que suprime grande parte de outros *Streptococcus* e permite o crescimento de todos os sorotipos de *mutans*. A principal vantagem deste meio, é que ele permite o isolamento desta espécie ainda quando presente em número reduzido. Amostras cariogênicas de *S. mutans*, contêm bacteriófagos lisogênicos e têm capacidade de se aderir ao vidro (Newbrun, 1988).

Ao contrário de muitos outros *Streptococcus* orais que fermentam apenas pequena quantidade de carboidratos, os *Streptococcus mutans* fermentam diversos açúcares. Este tipo de *Streptococcus* não hidrolisa a arginina, assim, uma definição de *Streptococcus mutans* seria *Streptococcus* α -hemolíticos, que fermentam o manitol e sorbitol, mas não hidrolisam a arginina, que permite diferenciá-lo dos demais *Streptococcus* orais (Newman-Nisengard, 1994).

Em 1962, T. Rosebury publicou um livro sobre microrganismos encontrados no organismo humano, descrevendo que muitos gêneros e espécies podiam ser isolados, em números significativos, tanto na situação de saúde como em doenças, considerando-se o mesmo sítio. Nesse sentido, sugeriu que fosse adotado o termo microbiota anfibiônica para expressar melhor a situação de anfibiose exercida por esses microrganismos, que tanto podem estar em simbiose (relação harmônica ou de equilíbrio) como em antibiose (relação desarmônica ou de desequilíbrio) com o hospedeiro (Uzêda, 2002).

O surgimento de doenças no ambiente bucal só ocorre quando há um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano como, por exemplo, um aumento significativo na ingestão de sacarose, que pode favorecer o desenvolvimento de espécies acidúricas e acidogênicas como o *Streptococcus*

mutans (Marcotte e Lavoie, 1998), favorecendo a desmineralização progressiva dos tecidos duros do dente (Thystrup e Fejerskov, 1988).

3.6. *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* compreende um grande número de espécies (mais de 100) de bacilos gram-negativos, e as que estão relacionadas ao homem são em torno de 25, sendo que 90% das amostras isoladas de material clínico correspondem a *Pseudomonas aeruginosa*, (espécie mais freqüente, aproximadamente em torno de 70% dos casos de infecção por *Pseudomonas*) *P. maltophilia* e *P. cepacia* (Trabulsi et al., 1999).

Atualmente, entre os gram-negativos, a *P. aeruginosa* é a que demonstra maior resistência aos antibióticos (Figueiredo et al., 2007), causando infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade (Pelegriani et al., 2002; Safdar et al., 2004), se posicionando entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, perdendo apenas para o *Staphylococcus coagulase* negativo e o *Staphylococcus aureus* (Sader et al., 2001).

Vêm sendo publicados no Brasil (Andrade, 2001; Kiffer, 2005) e em outros países (Sader, 2001; Raja, 2007), relatos sobre a redução da susceptibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos, destacando-se a diminuição de sensibilidade aos antibióticos de maior espectro de ação como os carbapenêmicos e as cefalosporina anti-pseudomonas (Landman et al., 2007; Nicoletti et al., 2006; Li et al., 2000 e Fuentesfria, 2008).

Segundo McGown (2006), e Livermore (2002), a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, isto é, da presença de múltiplos mecanismos de resistência em um único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos, é uma característica marcante e preocupante desta espécie.

Sua característica principal, é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina (Trabulsi et al., 1999), sendo este, um dos seus fatores de virulência conhecido (Phritiviraj, 2005).

A *P. aeruginosa* possui um ponto importante, sua grande capacidade de formar biofilme, inclusive em encanamentos, e quando isto ocorre em hospitais, a situação se agrava devido ao risco de ingestão de água contaminada por esta bactéria por pessoas debilitadas (Macêdo, 2000).

Esta é uma bactéria extremamente versátil, que pode ser encontrada em diversos ambientes, principalmente solo e água, ou ainda associada a plantas e animais, onde pode causar infecções oportunistas, podendo também causar em seres humanos infecções em indivíduos imunocomprometidos, como por exemplo, pacientes portadores de AIDS, câncer, vítimas de queimaduras e portadores de fibrose cística (Nicastro, 2009).

No paciente portador de fibrose cística, a *P. aeruginosa* coloniza os pulmões, onde produz grande quantidade do exopolissacarídeo alginato crescendo em forma de biofilme, regulado pelo mecanismo de *Quorum sensing*, que é o sistema pelo qual as bactérias detectam e respondem a mudanças em sua população, o qual tem papel impotente na regulação de expressão de vários fatores de virulência (Nicastro, 2009).

3.7. *Enterococcus faecalis*

São cocos gram-positivos, catalazes negativos, patógenos oportunistas, amplamente distribuídos na natureza e participam da microbiota normal do homem e dos animais, particularmente no trato intestinal, sendo de grande importância na medicina humana e animal (Trabulsi, 1999).

Em seres humanos, são isolados a partir de infecções graves, clinicamente significativas, tais como bacteremias, acompanhadas ou não de endocardite, infecções do trato urinário, biliar, infecções de feridas, infecções pélvicas e intra-abdominais, com altas taxas de morbidade e mortalidade das enterococcias entre pacientes hospitalizados (Trabulsi, 1999).

Esta bactéria está relacionada também a doenças do aparelho estomatognático, como as peridontopatias, que estão associadas à formação de um biofilme microbiano (Faveri, 2008), aparecendo em média em 70% nas amostras de saliva de indivíduos portadores desta enfermidade (Shimada, 2008).

As infecções orais associadas com *Enterococcus faecalis*, são comuns, mas estão restritas ao sistema de canal radicular dos dentes (Bachrach, 2002).

São freqüentemente isolados como componentes da flora bacteriana existente em infecções de canais radiculares dentários, quando este procedimento endodôntico foi falho (Hancock, 2001).

A presença desta bactéria nestas infecções, é particularmente explicada pela habilidade desta bactéria de sobreviver usualmente sobre um ambiente de stress, sua extrema resistência a medicamentos e substâncias irrigadoras usadas durante o tratamento endodôntico (Siqueira et al. 2000) e sua capacidade de invadir os túbulos dentinários radicular e permanecer viável (Love, 2001).

Considerando a multirresistência a drogas do *Enterococcus faecalis*, e seu relativo aceso à cavidade oral, uma terapia com antibióticos é recomendada para prevenir falhas no tratamento endodôntico (Payne et al., 2000).

3.8. *Escherichia coli*

São bacilos gram-negativos, da família enterobacteriaceas, encontradas amplamente na natureza, mas a maioria habita os intestinos do homem e dos animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (Trabulsi, 1999).

São bactérias patogênicas causadoras de infecções intestinais, urológicas, meningite do recém-nascido e bacteremias (Trabulsi, 1999).

Registros epidemiológicos revelam que a maioria dos surtos de doenças com origem alimentar, é oriunda de alimentos contaminados por bactérias como *Escherichia coli* entre outras (Pinto et al., 2004)

Bactéria enteropatogênica como a *Escherichia coli*, entre outras, são freqüentemente isoladas em infecções ocorridas em enfermarias e pediatrias de unidades hospitalares (Youssef, 2000), causando enfraquecimento em indivíduos imunocomprometidos por doenças ou terapias (Meng, 2002).

3.9. *Candida albicans*

Entre os sítios anatômicos, a cavidade bucal é um dos mais populosos, contendo uma microbiota diversificada (Takahashi, 2005), da qual fazem parte os fungos leveduriformes do gênero *Candida*, do qual já foram isoladas 27 espécies (Marsh, 1992 e Siqueira et al., 2004), e sua prevalência como comensal nesta região em indivíduos saudáveis é de 20 a 75% (Akpan, 2002 e Lynch, 1994).

A *Candida albicans* é o maior fungo patogênico que tem metabolismo flexível para assimilar a maior extensão de nutrientes do seu organismo

hospedeiro, além de fazer parte da microflora normal gastrointestinal do indivíduo saudável (Vieira et al., 2010). É um patógeno oportunista, que infecta primeiramente um hospedeiro imunocomprometido, causando desconforto superficial e também comprometimento sistêmico do organismo (Odds, 2002).

A cavidade oral é o habitat de uma rica flora microbiana, a qual é integrada por vírus, bactérias e fungos, convivendo em situação de anfibiose com o hospedeiro (Lacaz, 1970).

O fungo leveduriforme *C. albicans* ocorre saprofitamente, e tem sido isolado da boca, tubo digestivo, intestino, orofaringe, vagina e pele de indivíduos sadios causando infecções de origem endógena ou como transmissão exógena intra-hospitalar (Trabulsi, 1999), sendo necessário para isto, que fatores predisponentes alterem a integridade orgânica, mudando sua configuração de leveduriforme para fusiforme, tornando-se assim patogênico (Ramos, 1999).

Por sua capacidade de formar biofilme, demonstrada em experimentos *in vitro*, e sua comparação com estruturas encontradas em material médico-hospitalar, a *C. albicans* é responsável por contaminação persistente em indivíduos submetidos a procedimentos cirúrgicos (Suci, 2002).

Esta capacidade de formar biofilme, é que lhe dá grande resistência a agentes antifúngicos (Shuford, 2007), dando-lhe habilidade para crescer em diversas condições ambientais (Thein et al., 2007). Assim sendo, este biofilme é um importante fator de virulência para esta espécie de fungo (Hasan et al., 2009).

A candidíase, também denominada candidose, causada por *Candida albicans*, também chamada de estomatite cremosa ou sapinho, caracteriza-se pelo aparecimento de placas brancas, isoladas ou confluentes, aderentes à mucosa (Trabulsi, 1999), sendo uma das maiores preocupações da classe odontológica, devido ao aumento dos casos dessa infecção, principalmente relacionados a condições imunossupressoras (Santos et al., 2002).

A habilidade de produzir enzimas hidrolíticas da *C. albicans* é considerada importante fator patogênico (Barret, 1985). As principais enzimas consideradas fator de virulência, produzidas por leveduras do gênero *Candida*, são as proteinases que rompem ligações peptídicas, e fosfolipases que hidrolisam fosfoglicerolípídeos (Ghannoum, 1986), sendo que estas últimas somam 94% das enzimas produzidas (Ghannoum, 1990).

Além da mucosa orofaríngea, as candidíases acometem os brônquios, vagina, pele e anexos e trato gastrintestinal, podendo se tornar sistêmica em casos de septicemias, endocardites e meningites (Neufeld, 1999), visto que a *Candida albicans* é um microrganismo de natureza oportunista que depende de fatores predisponentes para acometer o indivíduo (Tamura et al., 2003).

A *C. albicans* é um fungo oportunista causando infecções sistêmicas principalmente em pacientes imunodeprimidos, portadores de neoplasias e transplantados (Mai et al., 2007), ainda em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia (Jham et al., 2007), internados em CTI pós-cirurgia neurológica, e portadores de Doença de Crohn (Vitse et al., 2009).

A *C. albicans* tem sido isolada no biofilme dentário (Arendorf et al., 1980; El Azizi et al., 2004 e Samaranayake et al., 1997), e este mecanismo de aderência microbiana à superfície dentária em congregação com *S. mutans* tem sido demonstrado em alguns estudos (Thein, 2006). Sua presença em lesões cariosas já tem sido bem reportada, assim como sua capacidade de invadir e se fixar em tecidos da boca, e em materiais como o acrílico, utilizado em vários tipos de próteses dentárias (Akdeniz et al., 2002; Baena et al., 2005; Cannon et al., 1995; Marcotte et al., 1998; Minagi et al., 1985 e Nikawa et al., 2003).

Santos et al. (2002), em um estudo, observaram a importância dos cuidados com a higiene bucal para a manutenção da saúde como um todo e que hábitos nocivos como tabagismo e alcoolismo podem favorecer a proliferação deste fungo e o desenvolvimento de infecção na cavidade bucal.

Mattos et al. (2009), em recente estudo, comprovaram a necessidade de portadores de comunicação buco-sinusal que utilizam próteses acrílicas, da esterilização das mesmas, para evitar uma re-infecção da mucosa oral por *C. albicans*.

O diagnóstico de candidíase orofaríngea é usualmente feito com base em suas manifestações clínicas (Katiraei et al., 2010).

A hipótese da associação entre *S. mutans* e *C. albicans*, é baseado em seus mecanismos de virulência e características bioquímicas, assim como em fatores endógenos e exógenos que favorecem ao hospedeiro, fornecer condições no ambiente bucal favorável para a ação destes microrganismos (Akdeniz et al., 2002; Moalic et al., 2001 e Thein et al., 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Vidrarias

Erlenmeyers

Funis de vidro

Placas de Petri

Béqueres

Bastões de vidro

Provetas

Alça de Drigalsky

Tubos de ensaio

Lâminas de vidro

Colunas de vidro utilizadas para cromatografia em coluna

4.1.2. Equipamentos

Evaporador rotativo (Marca Büchi, Modelo B-480)

Balança analítica (Marca Sartorius)
Autoclave (vertical modelo 503, Eletrolab)
B.O.D. Q-315, (Marca Quimis)
Estufa para esterilização (Brasdonto, modelo 4)
Jarra de anaerobiose (Marca Merck)
Capela de Fluxo Laminar (Cabine de segurança biológica- Pachane)
Densimat Bio-Merieux (Marca bio Mérieux)
Estufa de circulação de ar (MA 035 – Marconi)
Moinho de martelos (Marca Nogueira)
Microscópio (Zeiss/Germany, modelo Jeanamed 2)
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Marca Jeol, Modelo Eclipse, 400 MHz: ^1H e 100 MHz: ^{13}C)
Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de Massas (Marca Shimadzu, Modelo QP-5050)

4.1.3. Outros materiais

Solventes: diclorometano, metanol, acetato de etila (Marca Synth)
Papel de Filtro
Medidor de pH
Meio de cultura ágar Müller Hinton (Marca Merck)
Meio de cultura caldo Müller Hinton (Marca Merck)
Meio de cultura caldo BHI (Marca Merck)
Água destilada
Cloreto de Sódio (Marca Merck)
Sache de CO_2 (Marca Merck)
Alça de Platina
Gel de Sílica 60G (Merck, 0,063-0,200 mm)
Reagente de Dragendorff
 H_2SO_4 conc./Vanilina, seguido de aquecimento
Meio de Cultura ágar saboraud (Marca Merck)

4.1.4. Microrganismos testados

Nestes testes foram utilizadas cepas identificadas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Candida albicans* (ATCC 36801), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtidas das coleções do Laboratório de Sanidade Animal da UENF.

4.1.5. Espécies vegetais e substâncias padrão e sintetizadas utilizadas

Espécies Vegetais

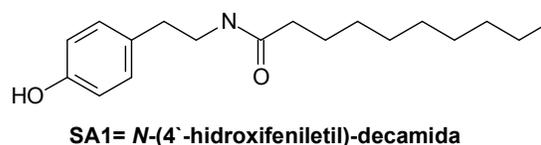
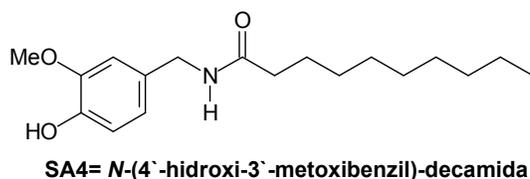
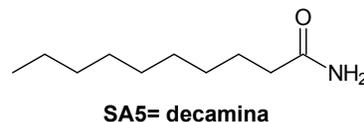
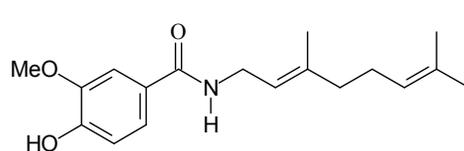
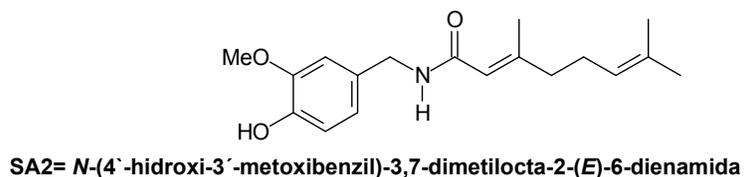
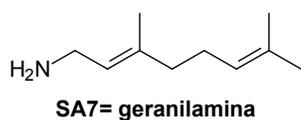
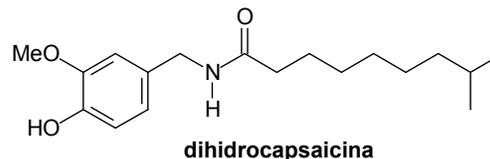
.*Mangifera indica*. Nome vulgar: manga (folhas)

.*Eugenia jambolana* (Syn. *Syzygium cumini*). Nome vulgar: jamelão (sementes, folhas e cascas do caule)

.*Schinus terebinthifolius*. Nome vulgar: aroeira-do-sertão (frutos)

.*Capsicum annum*. Nome vulgar: pimenta (frutos)

Substâncias padrão e sintetizadas



4.2. Metodologia

4.2.1. A escolha das plantas estudadas e coleta

Vários processos podem ser adotados, para a seleção de plantas. O critério adotado neste trabalho para a seleção das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana* (*Syzygium cumini*), *Schinus terebinthifolius* e *Capsicum annuum*, foi baseado em informações populares, sobre o efeito antimicrobiano e antifúngico destas plantas na cavidade oral.

As espécies *Mangifera indica* L., *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, foram coletadas no município de São João da Barra, Rio de Janeiro. A espécie *Capsicum annuum* foi cedida pelo Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF.

4.2.2. A escolha das substâncias sintéticas estudadas

O critério adotado neste trabalho para a seleção das substâncias estudadas foi baseado na semelhança estrutural das substâncias isoladas da espécie *Capsicum annuum*, a qual possui informações populares, sobre o efeito antimicrobiano e antifúngico destas plantas na cavidade oral. As substâncias foram sintetizadas no setor de Química Fina-LCQUI-UENF.

4.3. Secagem e moagem do material

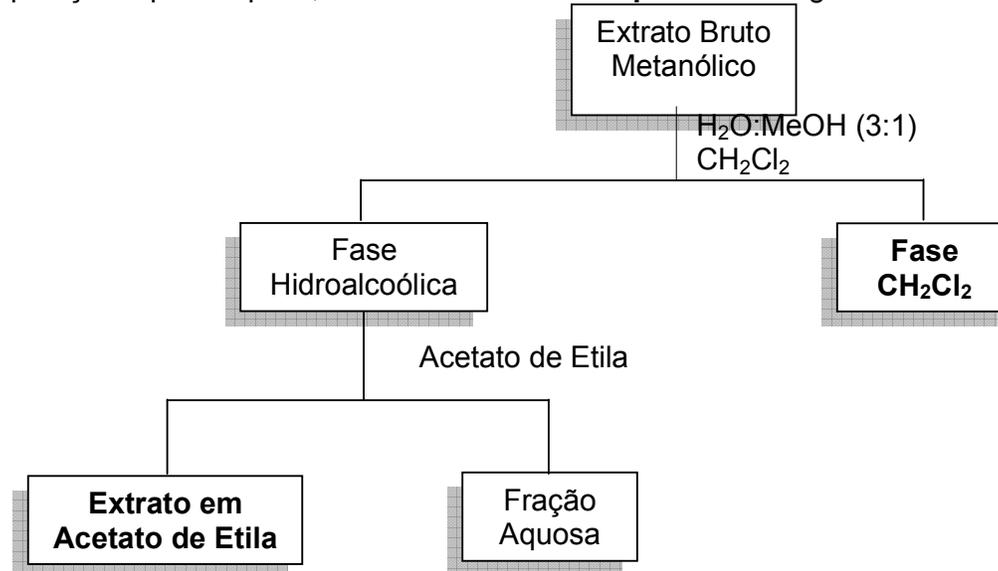
Após a coleta, as folhas, cascas dos galhos e sementes da *Eugenia jambolana*, as folhas de *Mangifera indica*, e os frutos de *Schinus terebinthifolius* e *Capsicum annuum*, foram lavados em água corrente e separados.

A secagem do material foi feita em estufa com circulação forçada de ar. A temperatura da estufa para a secagem das folhas e cascas dos galhos foi feita a 40°C. Para a secagem dos frutos e sementes, a temperatura da estufa foi de 65°C. O material após seco foi triturado em moinho de martelo e pesado.

4.4. Preparação dos extratos brutos vegetais

A extração do material das espécies foi feita por maceração usando metanol e os extratos foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Os extratos das espécies *Capsicum annuum* e *Eugenia jambolana*, que obtiveram os resultados antimicrobiano e antifúngico mais significativos sobre as bactérias e fungos testados nos experimentos preliminares, foram submetidos à partição líquido-líquido, conforme mostra o **Esquema 1** a seguir:



Esquema 1: Partição líquido-líquido (v/v) entre solventes imiscíveis dos frutos de *Capsicum annuum* e sementes de *Eugenia jambolana*.

4.5. Isolamento das substâncias bioativas dos extratos em diclorometano e acetato de etila dos frutos de *Capsicum annuum* frente às cepas de *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Os extratos em diclorometano e acetato de etila dos frutos de *Capsicum annuum* foram submetidos a análises comparativas por CCDA (Cromatografia em Camada Delgada Analítica), que posteriormente foram reunidas devido à similaridade dos constituintes químicos contidos nestes extratos. Os extratos depois de agrupados foram rotulados como **EP**, obtendo uma massa de 4,7303 g.

O extrato **EP** foi fracionado em coluna cromatográfica utilizando gel de sílica, e como eluente hexano: Acetato de etila com gradiente de polaridade, onde foram coletadas 22 frações. As frações que apresentavam o mesmo Rf quando analisadas por CCDA foram reunidas obtendo-se 7 frações, como mostra a **Tabela 1** abaixo.

Tabela 1: Estudo cromatográfico do extrato (EP)

Frações	Código	Quantidade(mg)	Substâncias	Obs.
1	EP-1	5,0	-	a
2-5	EP-2	680,0	-	a
6-7	EP-3	66,8	-	a
8-12	EP-4	442,3	-	a
13-15	EP-5	298,4	-	a
16-18	EP-6	332,2	-	a
19-22	EP-7	2.068,4	EP-2W impura	

^a Frações não trabalhadas (frações que não apresentaram atividade frente às cepas de *Streptococcus mutans*)

A fração **EP-7** (2.068,4 mg) foi novamente cromatografada em coluna com gel de sílica utilizando e como eluente hexano:Acetato de etila com gradiente de polaridade, onde foram coletadas 55 frações. As frações que apresentavam o mesmo Rf quando analisadas por CCDA foram reunidas obtendo-se 8 frações, como mostra a **Tabela 2** a seguir:

Tabela 2: Estudo cromatográfico da fração **EP-7**

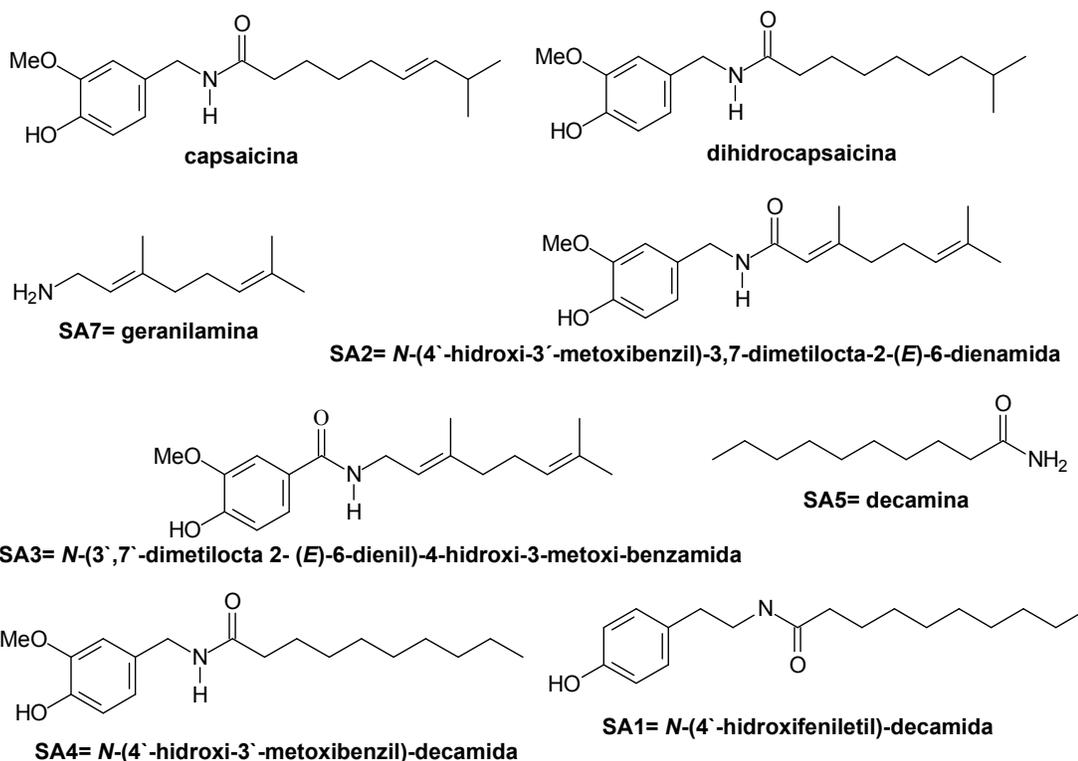
Frações	Código	Quantidade(mg)	Substância	Obs.
1-4	EP-7.1	4,1	-	a
5-10	EP-7.2	99,8	EP-2W	
11-15	EP-7.3	14,9	-	a
16-22	EP-7.4	321,0	-	a
23-30	EP-7.5	183,6	-	a
31-49	EP-7.6	697,1	-	a
50-55	EP-7.7	301,7	-	a

^a Frações não trabalhadas (frações que não apresentaram atividade frente às cepas de *Streptococcus mutans*)

Após isolamento da fração **EP-2W** realizou-se os espectros de RMN unidimensionais ^1H , ^{13}C e os bidimensionais ^1H - ^1H -COSY, HMQC e HMBC e massas. Os resultados obtidos foram comparados com os dados descritos na literatura para a capsaicina e dihidrocapsaicina, comprovando assim a proposta estrutural para a mistura das substâncias contidas na fração **EP-2W** (Gonçalves, 2010).

4.6. Síntese dos derivados da capsaicina

Os derivados da capsaicina descritos abaixo foram sintetizados segundo a metodologia descrita por Gonçalves, 2010.



4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annuum* L. substâncias isoladas e substâncias sinteticamente modificadas frente às cepas de *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

4.7.1. Preparo do inóculo

Os microrganismos utilizados neste trabalho, inicialmente estocados em glicerol e mantidos em freezer (-18°), foram reativados em BHI (para bactérias) e caldo Sabouraud (este para *Candida albicans*) e levados à estufa a 37° C, por 48 horas em tubos Falcon. Após este período, os tubos foram centrifugados e plaqueados em ágar sangue (bactérias) e ágar saboraud (fungo), e levados novamente à estufa a 37°C por 24 horas para crescimento.

O inóculo foi obtido a partir de cultivos de *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, em ágar Muller Hinton enriquecido de 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro, e ágar saboraud em seqüência e incubados por 24 horas a 37 °C, em anaerobiose (somente para *S. mutans*). Para favorecer este ambiente, foi utilizada jarra de anaerobiose contendo sachês de CO₂ (Merck), e aerobiose para os outros microrganismos, e por fim, as colônias obtidas foram lavadas com caldo Muller Hinton com uso de pipetadora automática e transferidas para cubeta de vidro.

Com o auxílio de cubeta de vidro contendo 2 mL de caldo Muller Hinton foi obtido o inóculo correspondente à concentração de 0,8 (1,5 x 10⁸ UFCs/mL) na escala 0,5 McFarland. Para tal foi utilizado um leitor de turbidimetria, equipado com leitor para um comprimento de onda igual a 510 Mn, automático (Densimat, bioMeriéux).

O número final de UFCs foi obtido pela conversão do número de colônias contadas, em triplicatas, e as suas respectivas diluições. O ensaio foi feito a partir do crescimento em placas de ágar Muller Hinton acrescidos de 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro (para *Streptococcus mutans*) e ágar Muller Hinton para as demais bactérias.

O preparo do inóculo de *Candida albicans* seguirá os mesmos passos descritos anteriormente mudando o meio de cultura por caldo Sabouraud.

4.7.2. Método de Difusão em ágar para Avaliação da Atividade Antimicrobiana.

Os meios de cultura ágar sangue (para *Streptococcus mutans*), ágar Muller Hinton (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*) e ágar sabouraud (*Candida albicans*), foram vertidos em placas de Petri.

Alíquotas de 100 µL das suspensões dos inóculos microbianos foram semeadas na superfície do meio de cultura, com o auxílio de suabes estéreis.

Em cada placa de Petri previamente semeada, foram perfurados cinco orifícios circulares (minipoços), com perfurador de 6 mm de diâmetro, em que foram colocados 50 µL do antibiótico gentamicina (na concentração de 10 µg/mL para as bactérias) ou 50 µL do antifúngico Vodol (na concentração de 10 mg/mL de água para o fungo). Dos extratos vegetais utilizados no teste, foram colocados em cada poço 50 µL de cada um, na concentração de 40 mg/mL (em DMSO). Das substâncias puras foram colocados 50 µL de cada, na concentração de 10 µg/mL (em etanol).

Após a incubação das placas, por 24hs, em estufa tipo B.O.D. a 37⁰C, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital (marca STARRET, Brasil). Os resultados do teste de suscetibilidade foram interpretados de acordo com a Tabela de zonas de inibição baseada em **Performance Standards** for Antimicrobial Disck Suscetibility Tests** (Laborclin, Paraná, Brasil).

4.7.3. Método de diluição em meio líquido para avaliação da Concentração Mínima Inibitória.

O teste de diluição em meio líquido, de acordo com Fava Netto (1975), foi o método utilizado para avaliar a concentração mínima inibitória dos extratos vegetais e das substâncias puras sobre as bactérias e o fungo citados no item anterior.

As bactérias e o fungo foram reativados em caldo e ágar Mueller Hinton (Merck). A concentração inicial do inóculo foi obtida a partir de colônias isoladas em placas de ágar Muller Hinton enriquecido de 5% de sangue desfibrinado estéril

de carneiro (somente para *Streptococcus mutans*), ágar Muller Hinton e ágar Sabraud e na seqüência por meio de diluição em caldo Muller Hinton estéril, até atingir uma turbidez equivalente a uma concentração 0.8 e 0.5 na escala McFarland, respectivamente para bactéria e fungos utilizando-se um fotômetro (Densimat, bio Mérieux).

A seguir foram feitas as diluições, com o inóculo inicial, na base dois (2) iniciando-se com 1:2 até 1:256 em caldo Muller Hinton e caldo Sabraud, para bactérias e fungos, respectivamente.

Como controle da esterilidade do extrato vegetal, foram usados tubos com diluições equivalentes àquelas utilizadas no teste antimicrobiano, sem o inóculo bacteriano. Todos os testes serão realizados com três repetições.

As leituras foram feitas após o período de incubação de 24 horas, a 37 °C. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez nos tubos. Em seguida, o caldo contendo crescimento bacteriano de cada tubo foi repicado em ágar sangue, ágar Muller Hinton e ágar Sabraud inclusive dos tubos de controle, e incubados novamente a 37 °C por 24 horas, para observação de crescimento bacteriano e fúngico, além de possíveis efeitos bacteriostático/bactericida e fungistático/fungicida.

4.7.4. O teste de atividade das substâncias purificadas em cepas padronizadas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

Os microrganismos utilizados para este estudo serão o *Streptococcus mutans* e a *Candida albicans*, porque foram os microrganismos que mostraram maior sensibilidade a estas substâncias, seguindo a metodologia do item 3.

4.8. Análises estatísticas

Os dados referentes ao halo de inibição de crescimento das bactérias em meio de cultivo foram analisados sob delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Analizou-se a distribuição normal dos erros e por meio da análise da variância as hipóteses foram testadas considerando-se 5% de probabilidade de erro Tipo I, para então as médias serem comparadas pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$). Quanto à *C. Albicans* foram calculadas as médias e o desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse trabalho, no processo de seleção das espécies vegetais de ação antimicrobiana, utilizou-se o conhecimento popular e na seqüência avaliou-se o efeito dos extratos em diclorometano, acetato de etila e metanol em diferentes partes das plantas, tais como, frutos, semente e cascas, os quais se encontram na **(Figura 1, pág. 36)**. Para efeito de controle, foi utilizado o antibiótico gentamicina, obtendo um halo de inibição de 30 mm.

Os extratos de jamelão revelaram efeitos significativos ($P < 0,05$) na inibição do crescimento de *S. mutans*, exceto para o extrato da casca em acetato de etila **(Figura 1, pág. 36)**. Os dados mais promissores quanto ao efeito antimicrobiano foram observados para o extrato obtido das cascas do caule em diclorometano (21 mm) e os das sementes obtidos em diclorometano (20 mm) e acetato de etila (27 mm) **(Figura 1, pág. 36)**.

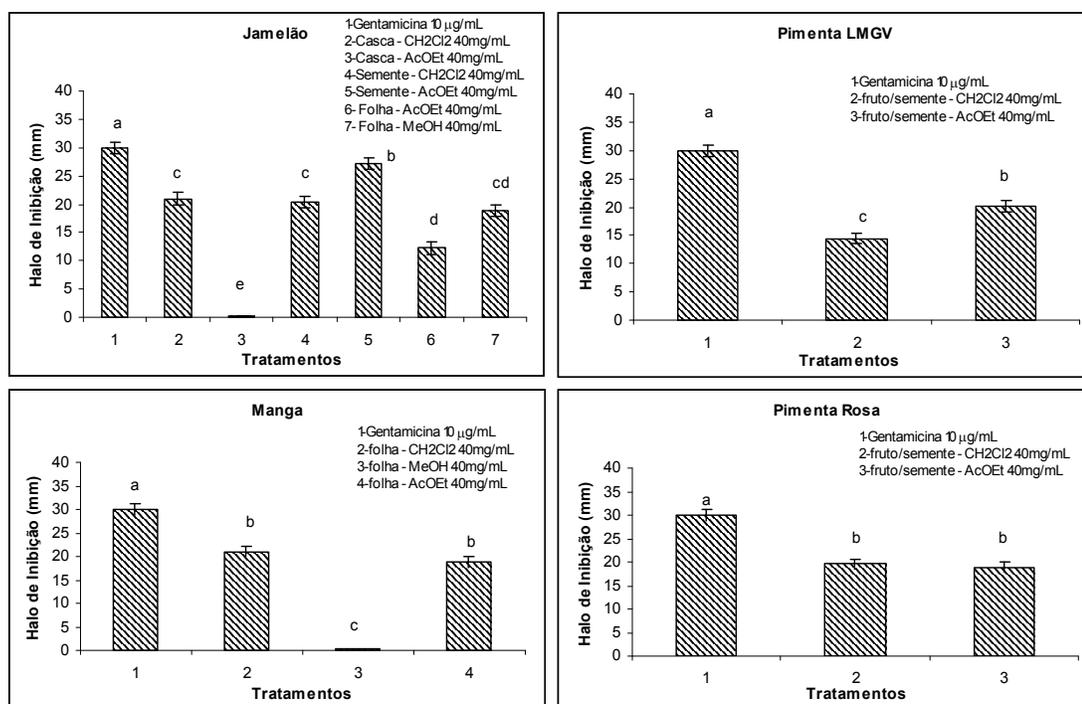
Quanto aos extratos obtidos da pimenta LMGV, o que apresentou resultado significativo ($P < 0,05$) de maior ação antimicrobiana, foi o de acetato de etila (20,11 mm), e o de diclorometano apresentou 14mm de halo de inibição **(Figura 1, pág. 36)**.

Quando se testou os extratos de folhas de manga, em diclorometano (21 mm) e acetato de etila (18 mm), os resultados inibitórios foram significativamente

iguais ($P < 0,05$), enquanto o extrato em metanol, não apresentou resultado inibitório (**Figura 1, pág. 36**).

Os extratos em diclorometano e acetato de etila da aroeira-do-sertão, apresentaram resultados significativamente semelhantes ($P < 0,05$) para halo de inibição, de 19 e 18 mm, respectivamente (**Figura 1, pág. 36**).

Muitas plantas podem apresentar efeito inibitório ao crescimento de bactérias da cavidade oral (Pack et al., 1998), particularmente *S. mutans* com o controle das placas e prevenção à carie. Xavier e Vijayalakshmi (2007) constataram efeito inibitório dessa bactéria com extrato etanólico do bulbo de *Allium sativa*, seguido pelo extrato de folhas de *Azadiracta indica* (Nim).



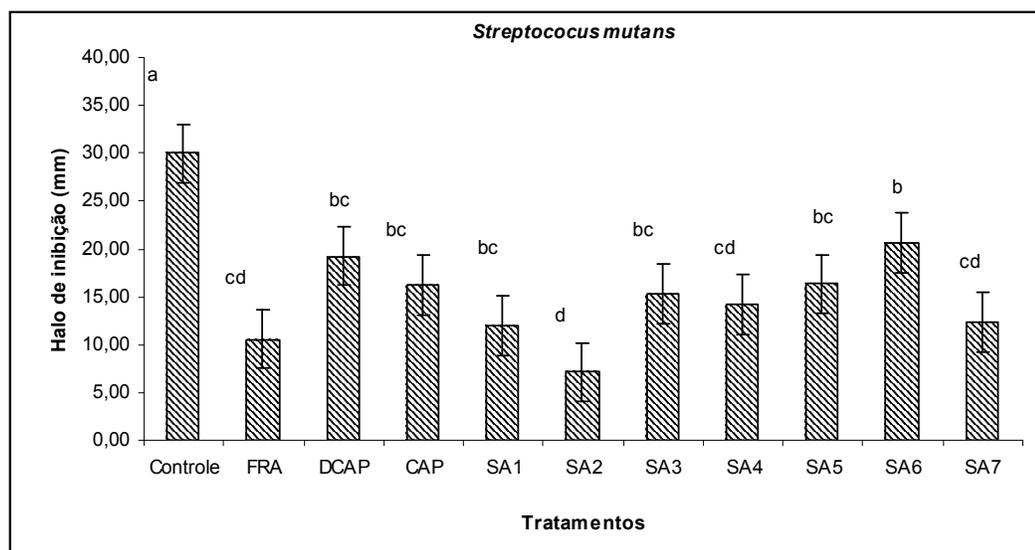
- Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ($P < 0,05$).

Figura 1: Média do halo de inibição (mm) do crescimento de *Streptococcus mutans* para seleção de extratos vegetais com ação antimicrobiana.

Apesar de promissores resultados observados para os extratos de manga, Jamelão e aroeira-do-sertão, não foram ensaiados quanto ao método 1. Para a avaliação da atividade antimicrobiana sobre *S. mutans* no bioensaio a seguir (método 1), foram selecionados apenas o extrato em acetato de etila de *Capsicum annuum*; FRA: DCAP+CAP; DCAP: dihidroxicapsaicina; CAP: capsaicina e os análogos sintéticos da capsaicina: SA1, SA2, SA3 e SA4. Essa

escolha se justifica pela alta demanda de tempo que exigiu o isolamento de substâncias com atividade antimicrobiana do extrato bruto de *C. annuum*, diminuindo a disponibilidade de tempo para as demais análises.

Na análise da inibição do crescimento de *S. mutans*, observou-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as substâncias padrões e os análogos aos padrões, como descrito na **Figura 2** abaixo, sendo que SA6 apresentou halo de inibição de 20,67 mm, seguido da DCAP (19,22 mm), CAP (16,22 mm), SA5 (16,33 mm) e SA3 (15,33 mm).



* Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem entre si, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$). Legenda: Controle-Gentamicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); FRA: DCAP+CAP; DCAP: dihidroxicaapsaicina; CAP: capsaicina e os análogos sintéticos da capsaicina: SA1, SA2, SA3, SA4, SA5, SA6 e SA7.

Figura 2. Média do halo de inibição (mm) do crescimento de *Streptococcus mutans* para a capsaicina e seus análogos sintéticos.

Na avaliação da concentração mínima inibitória foi testado somente para *S. mutans* que apresentou maior sensibilidade para todos os tratamentos quanto ao halo de inibição do crescimento. Assim, sendo observou-se que o meio de cultura utilizado era propício para o desenvolvimento de *S. mutans*. A gentamicina inibiu seu crescimento a partir de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Tabela 3, pág. 38**). O extrato bruto de *C. annuum* em acetato de etila inibiu o crescimento dessa bactéria a partir de 2,5 mg/L.

Khan et al (1978), testaram o extrato bruto etanólico de *E. natalensis*, contra o *S. mutans*, e obtiveram como concentração mínima inibitória 100 mg/mL. Resultado superior obteve a autora deste trabalho com a mesma bactéria.

Soares (2008), testando o extrato metanólico de *Stryphnodendro adstringens*, sobre cepas de *S. mutans*, conseguiu concentração mínima inibitória, acima de 400 µg/mL, não definido assim a concentração ide inibição ideal.

Quanto à FRA, e aos análogos sintéticos SA2, SA3 e SA4 a concentração mínima inibitória foi de 2,5 µg/L. As substâncias DCAP e CAP apresentaram valores de 1,25 µg/L e SA1 de 5 µg/L como concentração mínima inibitória.

Green et al (2008), testando derivados do ácido anacárdico (*Anacardium occidentale* L.), conseguiram inibir o *S. mutans* em uma concentração de 0,78 µg/mL do 6-(4',8'-dimetilnonila) do ácido salicílico, resultado parecido com o deste trabalho para as substâncias isoladas de *Capsicum annum*.

As cepas das bactérias *S. mutans* e *P. aeruginosa* apresentaram significativa ($P < 0,05$) inibição do crescimento quando tratadas com o antibiótico gentamicina (10 µg/mL), apresentando halo de inibição média de 30,00 mm quando comparados com *E. coli* que apresentou em média 18,11 ($\pm 0,5$) mm (**Tabela 4, pág. 41**). Quanto à *E. faecalis*, foi observada resistência ao antibiótico gentamicina, bem como à todos os tratamentos testados. Pode-se justificar esses dados pelo fato de *E. faecalis*, em muitos casos apresentar multi-resistência a antimicrobianos, sendo um dos principais microrganismos isolados de infecções hospitalares (Trabulsi, 1999).

Resultado semelhante ao desse trabalho, mostraram Baratto, et al (2008), quando testando extratos etanólicos de folhas de *Mikania laevigata*, não obtiveram halo de inibição em nenhuma das concentrações testadas (1,25; 2,5; 10; 25; 50 e 100 mg/mL). Ferreira et al (2010), conseguiram inibir o *E. Faecalis*, com extrato bruto etanólico de *Aegiphila sellowiana* na concentração de 200 µg/mL.

Enfatiza-se que, *E. coli* não apresentou significativa sensibilidade ($F=3790,99$; $P < 0,05$) medido pela inibição do halo de crescimento quanto aos tratamentos testados, exceto pela sensibilidade a gentamicina, indicando que esta cepa mostrou-se resistente aos outros tratamentos.

Quanto à *E. coli*, Carvalho, et al (2002), obtiveram inibição significativa (media de halo de 15mm) com extratos de folhas e caule de *Psidium guajava* L., talvez porque usaram uma concentração de 100mg/mL, 50% superior à utilizada nesse trabalho.

Virtuoso et al (2008), testaram extratos brutos de lenho (177,9 mg/mL) e de córtex (194,8 mg/mL), de *Cereus jamacaru* DC, sobre cepa de *E coli*, e obtiveram, nestas concentrações, (maiores do que no presente trabalho) 100% de inibição da *E. coli*. Brito et al., (2007), em testes com extrato bruto de Mastruz, na concentração de 8 mg/mL, comprovaram que este vegetal não tem nenhuma ação inibitória sobre esta bactéria.

Quando se compara o efeito do extrato de *C. annuum* em acetato de etila entre microrganismos, observa-se que somente *S. mutans* apresentou sensibilidade (11,96 ± 0,35 mm). Cabe ressaltar que, a pimenta utilizada para a elaboração do extrato, foi obtida dos acessos UENF 1421 e UENF 1381 de *C. annuum*. Considerando-se, ainda, a análise entre microrganismos, a fração do extrato que contém dihidroxicapsaicina e capsaicina, não apresentou efeito significativo (P<0,01).

Ainda na comparação entre microrganismos, observou-se que a dihidroxicapsaicina, a capsaicina e seus análogos apresentam efeito significativo (P<0,01) tanto para *S. mutans* quanto para *P. aeruginosa*. Portanto, pode-se concluir que essas substâncias presentes no extrato, apresentaram potencial inibição do crescimento tanto para *S. mutans*, como *P. aeruginosa*, mas não para *E. faecalis* e *E. coli*, efeito também comprovado por Carvalho (2010), com extrato de *Capsicum annuum* L.

Quanto ao fungo *C. albicans*, salienta-se que seus resultados não podem ser comparados aos obtidos para bactérias testadas por motivo de alterações metodológicas quanto ao controle, pois nesse caso utilizou-se nitrato de miconazol e não gentamicina (**Tabela 4, pág. 41**). Todavia, observou-se em média 26,11 (±0,19) mm de halo de inibição de crescimento, quando a cepa foi tratada com o fungicida nitrato de miconazol (50% v/v) e sensibilidade quando se utilizou os análogos sintéticos da capsaicina, SA1 (1,89 ±1,64 mm) e SA2 (9,55 ±0,50 mm).

Tabela 4: Valores médios do halo (mm) de inibição do crescimento *in vitro* de microorganismos da cavidade oral sob aplicação do extrato de pimenta (*Capsicum annuum*), dihidroxicapsaicina, capsaicina e seus análogos sintéticos.

Microrganismos						
Tratamentos	Teste F	SM	EF	PA	EC	CA
Controle	1632,60*	30,00a	-	30,00a	18,11b	26,11(±0,19)
EXT	3483,21*	11,96a	-	0,00b	0,00b	0,00
FRA	3,83 ^{ns}	7,06	-	9,78	0,00	0,00
DCAP	152,33*	15,30a	-	9,89b	0,00c	0,00
CAP	81,40*	12,30a	-	11,77a	0,00b	0,00
SA1	218,89*	16,20a	-	1,89b	0,00b	1,89(±1,64)
SA2	24,73*	19,20a	-	5,22b	0,00b	9,55(±0,50)
SA3	463,07*	13,96a	-	10,11b	0,00c	0,00
SA4	801,80*	20,10a	-	13,55b	0,00c	0,00

*P<0,01; ns-não significativo. Médias seguidas das mesmas letras na linha não diferem entre si, segundo o teste Tukey (P<0,05). Legenda: Controle- Gentamicina (10 µg/mL), exceto para CA quando se usou nitrato de miconazol (50% v/v); EXT: Extrato em acetato de etila de *C. annuum*; FRA: DCAP+CAP; DCAP: dihidroxicapsaicina; CAP: capsaicina e análogos sintéticos da capsaicina: **SA1**, **SA2**, **SA3** e **SA4**. **SM**: *Streptococcus mutans*; **EF**: *Enterococcus faecalis*, **PA**-*Pseudomonas aeruginosa*, **EC**: *Escherichia coli* e **CA**: *Candida albicans* (média ± DP).

Analisando-se o halo de inibição do crescimento de *S. mutans* observa-se sensibilidade para todos os tratamentos testados (**Figura 2, pág. 37**). Tanto o extrato de *C. annuum* (11,96 ± 0,35 mm) como a fração que continha capsaicina e dihidroxicapsaicina (7,06 ± 3,20 mm), apresentaram significativamente (P<0,05) menor ação inibidora em comparação à capsaicina e aos seus análogos testados. Esse fato se justifica pelo sinergismo entre substâncias, que provavelmente estão contidas no extrato.

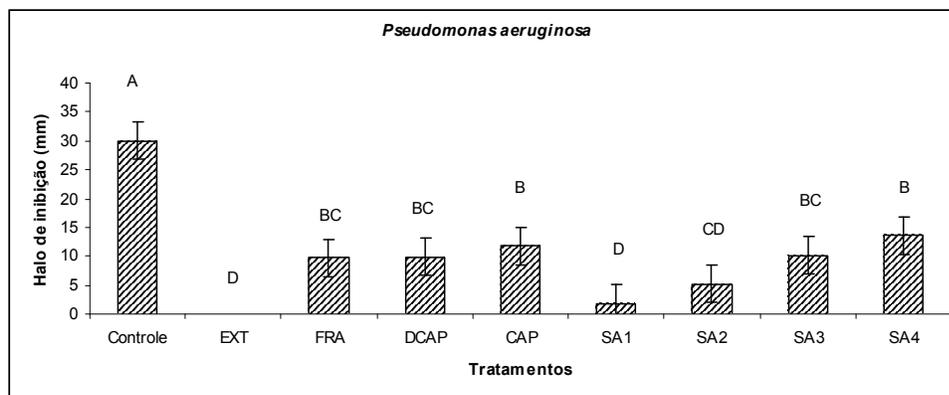
Melo, et al (2006), em seu trabalho similar a este, conseguiram a mesma inibição do *S. mutans*, só que em uma concentração bem inferior de extrato da casca do caule de *Anacardium occidentale* L., (12,5 mg/mL), concluindo que esta planta tem maior efeito antibacteriano do que o extrato bruto de *C. annuum*.

Entretanto, o análogo da capsaicina, *N*-(4'-hidroxi-3'-metoxibenzil)-decanamida, codificada nesse estudo como SA4, apresentou significativamente (P<0,05) menor halo de inibição (20,10 ± 0,17 mm) em comparação à gentamicina (30,00 ± 0,00 mm), usada como controle, porém esse valor foi superior aos demais tratamentos testados.

Esses dados indicam a bioatividade dessas substâncias de síntese, frente a cepas de *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negativas; ao passo que, o mesmo efeito não foi observado para as demais bactérias, gram-negativas. O mecanismo de ação antimicrobiano, mais comum, trata-se da atividade sobre a estrutura da membrana citoplasmática, desnaturando e precipitando proteínas. Mais especificamente, atuam alterando a permeabilidade por íons de hidrogênio (H^+) e potássio (K^+) ou cálcio (Ca^{++}), ocasionando perda do controle quimiosmótico intermembranar. Caterina et al. (1997) identificaram, através de clonagem molecular, os receptores vanilóides responsáveis pela sensação de calor. O mecanismo de ação da ativação desses receptores pelo calor e pela capsaicina ocorre por meio da abertura de canais de cálcio não seletivos, que são altamente permeáveis ao cálcio. Íons hidrogênio e lipídios são ativadores endógenos desses receptores, induzindo a uma excitação mantida e prolongada.

A bactéria *P. aeruginosa* é facilmente encontrada no meio ambiente, especialmente em solo e água (Nicastro, 2009). Na cavidade oral está presente comumente em pacientes com periodontite (Castro et al., 2009).

Nesse estudo, observou-se que o crescimento de *P. aeruginosa* foi inibido por todos os tratamentos, excetuando-se o extrato de *C. annuum* em acetato de etila. Todavia, quando se testou a fração do extrato que continha capsaicina e dihidroxicapsaicina evidenciou-se a bioatividade dessas substâncias (**Figura 3, pág. 43**). A não ocorrência de atividade inibidora no extrato original, e sim durante o fracionamento do extrato, pode ser justificada por várias causas, inclusive pelo sinergismo ou antagonismos quando há combinação de substâncias em diferentes concentrações.



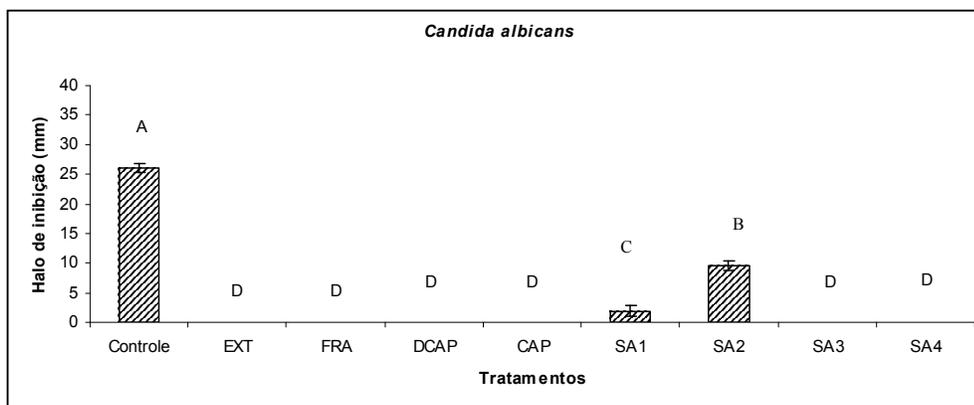
* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey ($F=44,28$; $P<0,05$). **Legenda:** Controle: Gentamicina (10 $\mu\text{g/mL}$); EXT: Extrato em acetato de etila de *Capsicum annuum* (40 mg/mL); FRA: DCAP+CAP; DCAP: dihidroxicapsaicina; CAP: capsaicina e análogos sintéticos da capsaicina: **SA1, SA2, SA3 e SA4**.

Figura 3: Média do halo de inibição do crescimento *in vitro* de *P. aeruginosa* sob aplicação do extrato de pimenta (*C. annuum*), dihidroxicapsaicina, capsaicina e seus análogos sintéticos.

Baratto, (2008), em seu trabalho com *Pseudomonas aeruginosa* e o extrato bruto de *Mikania laevigata* na concentração de 100 mg/mL, uma concentração 50% maior que a do extrato de *C. annuum* utilizado neste trabalho, não obteve inibição desta bactéria.

Cabe reforçar que, assim como ocorreu com *S. mutans*, a substância SA4 também proporcionou redução no crescimento de *P. aeruginosa* ($13,55 \pm 1,07$ mm) não diferindo ($P<0,05$) da capsaicina ($11,77 \pm 1,50$ mm), conforme pode ser visto na **Figura 3**. Por sua vez, a dihidroxicapsaicina ($9,78 \pm$ mm), não diferiu ($P<0,05$) da substância SA3 ($10,11 \pm 0,19$ mm). Em sua essência, esses valores indicam a sensibilidade de *P. aeruginosa* quando tratada com essas substâncias.

Ao comparar os tratamentos testados sobre o fungo *C. albicans*, conforme mostrado na **Figura 4, pág. 44**, destacou-se a ação inibidora do fungicida nitrato de miconazol (50% v/v), que foi em média de $26,11 (\pm 0,19)$ mm e a sensibilidade às substâncias SA1 ($1,89 \pm 1,64$ mm) e SA2 ($9,55 \pm 0,50$ mm).



- Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, segundo o Teste Tukey (F=696,92; P<0,05). **Legenda:** Controle- Nitrato de miconazol (50%, v/v); EXT: Extrato em acetato de etila de *Capsicum annuum* (40 mg/mL) FRA: DCAP+CAP; DCAP: dihidroxicapsaicina; CAP: Capsaicina e análogos sintéticos da capsaicina: SA1, SA2, SA3 e SA4.

Figura 4: Média do halo de inibição do crescimento *in vitro* de *C. albicans* sob aplicação do extrato de pimenta (*Capsicum annuum*), dihidroxicapsaicina, capsaicina e seus análogos sintéticos.

Samie et al (2005), em seu trabalho com extrato bruto de *Annona senegalensis* conseguiram uma concentração mínima inibitória maior que 12 mg/mL sobre o *Streptococcus mutans*. Neste trabalho, a concentração mínima inibitória do extrato bruto de *Capsicum annuum* obtida sobre a mesma bactéria, foi de 2,5 mg/mL, demonstrando assim maior efeito antibacteriano.

More et al (2008), testando o extrato bruto de *Annona senegalensis* sobre o *Streptococcus mutans*, obtiveram como concentração mínima inibitória, 12,5 mg/mL, resultado também maior do que o obtido neste trabalho.

Ferreira et al. (2010), em seu trabalho com extratos vegetais de *Aegiphila sellowiana*, (1 mg/mL) sobre *S. mutans* (método de diluição em caldo), conseguiram inibição maior que no presente trabalho com extrato de *Capsicum annuum* (2,5 mg/mL). A diferença talvez seja pela diferença de metodologia, já que neste trabalho foi utilizado o método de difusão em ágar.

6. CONCLUSÃO

As cepas utilizadas de *Enterococcus faecalis* e *Echerichia coli* não são inibidas pelo extrato bruto de *Capsicum annum*, *Mangifera indica*, *Schinus terenbintifolius* e *Eugenia jambolana*, capsaicina e dihidroxicapsaicina, ou pelos análogos estudados. As cepas testadas de *Pseudomonas aeruginosa* foram sensíveis à capsaicina e ao seu análogo sintético SA4 (*N*-(4'-hidroxi-3'-metoxibenzil)-decanamida).

O fungo *Candida albicans* (ATCC 36801), também não foi inibido por nenhum dos tratamentos acima citados. Ao avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e substâncias testados, observou-se que estes tratamentos inibiram significativamente o *Streptococcus mutans*, principal bactéria causadora da cárie dental. Os análogos sintéticos da capsaicina SA2 e SA4, bem como a dihidroxicapsaicina, apresentam efeito antimicrobiano satisfatório sobre o *Streptococcus mutans*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostine-Costa, T. S.; Silva, D. B. da Jambolão: a cor da saúde (2008) Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Jambolao/index.htm. Acesso em: 25/10/2010.

Agra, M. F (1999) *Diversity and distribution of Solanum subgenus Leptostemonum in north-east Brazil*. In: NEE, M. et al. (Ed). *Solanaceae IV*. Kew: Royal Botanic Garden. p.197-203.

Akdeniz, B. G; Koparal, E; Sem, B. H; Ates, M; Denizci, A. A. (2002) Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. *Journal of Dentistry Children*, 69:289-292.

Akpan, A; Morgan, R. (2002) Oral candidiasis: *Posgrad Medical Journal*, 78:455-459.

Aksoy, A., Duran, N., Koksai (2006) *In vitro* and *in vivo* antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 51:476-481.

Albuquerque, U. P; Hanazaki, N. (2006) As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16(supl.):678-689.

Arendorf, T. M; Walker, D. M. (1980) The prevalence and intra oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archive Oral Biology*, 25:1-10.

Bachrach, G; Zigmond, M. L; Zlotkin, A; Naor, R; Steinberg, D. (2002) Bacteriophage isolation from human saliva. *Letters in Applied Microbiology*, 36:50-53.

Baena, M. T; Morenoa, M. M. V; Franco, M. F; Adalpe, B. B; Quindos, G; Sanches, V. L. O. (2005) *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Medical Oral pathology and Oral Chirurgical Bucal*, 10:27-39.

Baratieri, L. N. (1992) *Dentística, procedimentos preventivos e restauradores*. 2^a Ed. São Paulo: Editora Quintessence, 509p.

Baratto, L; Lang, K. L; Vanz, D. C; Reginatto, F. H; Oliveira, J. B; Falkenerg, M. (2008) Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 577-582.

Barbieri, D. S. A. V; Vicente, V. A; Fraiz, F. C; Lavorant, O. J; Svidzinski, T. I. E; Pinheiro, R. L. (2007) Analysis of the *In Vitro* Adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida Albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:624-63.

Barret, B. K., Hayes, Y., Wilson, R. G., Ryley, J. F. (1985) A comparison of phospholipase activity cellular adherence and pathogenicity of yeast. *Journal of General Microbiology*, 131:1217-1221.

Barroso, G.M. (1991) *Sistemática de angiosperma do Brasil*. v.2, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa-Imprensa Universitária, 377p.

Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Rapp B. A., Wheeler D. L. (2000) Property values tagged with IC are from the ZIC/VINITI data file provided by InfoChem. CAS Registry is a service mark of the American Chemical Society - Genbank.

Bonetti, M.L.G.Z. (2002) *Heterose e Capacidade de Combinação de Linhagens de Pimentão (*Capsicum annuum* L.)*. Tese de Doutorado- Universidade Federal de Lavras, MG. 128p.

Bowden, G. H. (1996) Mutans Streptococci caries clorhexidine. *Journal Canadense Dental Association*, 62:700-706.

Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução da Diretoria Colegiada RDC n.48, de 16 de Março de 2004.

Brito, M. S. E; Carvalho, D. S; Albuquerque, A. M. M. (2007) Efeito do extrato de Mastruz em Culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Paraense de Medicina* 21:1.

Brown, P., Nicolini, S., Onetto, J.E. (1991) *Cáries*. Ediciones de la Universidad de Viña Del Mar, 148p.

Calderón, A. I., Angerhofer, C. K., Pazzuto, J. M. (2000) Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a forest of Panama. *Economic Botany*, 54:278-294.

Calixto, J. B. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal and Biological Research*, 33:179-189.

Canettieri, A. V. C; Kretchetoff, F. Y; Fugarra, F. C; Moreira, D; Unterkircher, C. S. (2006) Efeito do anticorpo monoclonal 56G sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* em caldo e no acúmulo de placa bacteriana *in vitro*. *Ciências Odontológicas Brasileira*; 9:67-75.

Cannon, R. D; Holmes, A. R; Mason, A. B; Monk, B. C. (1995) Oral *Candida*: clearance, colonization or Candidiasis. *Journal of Dental Research*, 74:1152-1161.

Carvalho, A. A. T; Sampaio, M. C. C; Sampaio, F. C; Melo, A. F. M; Sena, K. X. F. R; Chiappeta, A. A; Higino, J. S. (2002) Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram negativas. *Acta Farmacologica Bonaerense* 21:255-258.

Carvalho, F. G., Silva, D. S., Hebling, J., Spolidoro, L. C., Spolidoro, D. M. P. (2006) Presence of *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. In dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, São Paulo, 51:1024-1028.

Carvalho, H. H.; Wiest, J. M.; Cruz, F. T. (2010) Atividade Antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxoinfectivas alimentares. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12:8-12.

Castro, A. L; Vieira, E. M. M; Arêde, L. T; Jardim Jr., E. G. (2009) Infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em tumor odontogênico queratocístico. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*; 75:157.

Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M. (1997) The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389:816-824.

Charbeneau, G. T., Cartwright, C. B., Constock, F. W., Kahler, F. W., Snyder, D. T., Dennison, J. B., Margeson, R. D. (1978) *Dentística Operatória*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 448p.

Coelho, L. G. C; Souza, L. V. N. F; Oliveira, E. A; Rodrigues, S. M; Vargas, A. M. D; Ferreira, E. F. (2008) Ação antimicrobiana de soluções de uso doméstico sobre a espécie *Candida albicans* proveniente de cultura de estoque da cavidade bucal de idosos. *Arquivos em Odontologia*, 44:5-9.

Cvitkovitch, D. G; Li, Y. H; Ellen, R. P. (2003) Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112: 1626-1632.

Dallwitz, M. J; Dallwitz, W. *Solanaceae L. the Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification Retrieval*. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Solanaceae>, em 27/6/2010.

Dvey, M. E. & O'toole, G. A. (2000) Microbial biofilms: from Ecology Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 64:847-867.

De Oliveira, R. N., Dias, I. J. M., Câmara, C. A. G. (2005) Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC de diferentes localidades de Pernambuco. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15:39-43.

Donadio, L. C. (1997) Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal-SP. *Acta Horticultura*, 452:181-183.

El Azizi, M. A; Starks, S. E; Khadori, N. (2004) Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* SSP. And bacteria in the biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 96:1067-1073.

Evans, R. C; Holmes, C. J. (1987) Effect of vancomycin hidroclochloride on *Staphylococcus epidermis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31: 889-894.

FAO. Agricultural production data collection (2003) Disponível em: <http://apps.fao.org>.

Fava Netto, C. (1975) *Antibióticos*. In: Lacaz, C. S. (org.) *Antibiograma*. 3ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, p. 221-233.

Faveri, M; Mayer, M. P. A; Feres, M; Figueiredo, L. C; Dewhirst, F. E; Paster, B. J. (2008) Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S RRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology*, 23:112-118.

Ferreira, M. A; Carvalho, T. C; Turatti, I. C. C; Furtado, N. A. J. C; Martins, C. H. G; Lopes, N. P; Cunha, W. R; Crotti, A. E. M. (2010) Antimicrobial activity of *Aegiphila sellowiana* Cham., Lamiaceae, against oral pathogens. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20:246-249.

Figueiredo, E. A. P; Ramos, H; Maciel, M. A. V; Vilar, M. C. M; Loureiro, N. G; Pereira, R. G. (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência de a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/Pe. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, São Paulo, 19:1-7

Forssten, S. D; Björklund, M; Ouwehand, A. C. (2010) *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients*, 2:290-298.

França, F., Cuba, C. A., Moreira, E. A., Almeida, M., Virgens, M. L., Marsden, P. D. (1993) Avaliação do extrato de casca de cajueiro branco (*Anacardium occidentale*) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 26:151-155.

Fuenteria, D. B; Ferreira, A. E; Graf, T; Corção, G. (2008) *Pseudomonas aeruginosa*: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41:1-6

Ghannoum, M., Abu, E. K. H. (1986) Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *Journal Medical and Veterinary Microbiology*, 24: 407-413.

Ghannoum, M., Abu, E. K. H. (1990) Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*, 33:265-282.

Gibbons, R. J; Hay, D. I. (1989) Adsorbed salivary acidic praline rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. *Journal of Dental Research*, 68:1303-1307.

Gomes, R. P. (1973) *Fruticultura Brasileira*. São Paulo: Editora Livraria Nobel, 448p.

Gonçalves, P. S. (2009) *Síntese de Análogos de Capsaicina e Nova Síntese da Diidrocapsaicina como Potenciais Substâncias Antibacterianas*. Tese de Mestrado-Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 100p.

Green, I. R; Tocoli, F. E; Lee, S. H; Nihei, K; Kubo, I. (2008) Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43:1315-1320.

Hamada, S; Oosshima, T. (1975) Production and properties of bacteriocins (mutacins) from *Streptococcus mutans*. *Archive of Oral Biology*. 20:641-648.

Hancock, H. H; Sigurdson, A; Trope, M; Meiseiwitsch, J. (2001) Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery, Oral Medical, Oral Pathology and Oral Radiology Endodontic*, 91:579-586.

Hassan, F; Xess, I; Wang, X; Jain, N; Fries, B.C. (2009) Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infection*, 11:753-761.

Huffman, M. A. (2003) Animal self-medication and ethnomedicine: exploration and exploitation of the medical properties of plants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63:371-381.

Hunziker, A. T. (2001) *Genera Solanacearum*. Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag. 500p.

Hussein, S. A. M., Hashem, A. N. M., Seliem, M.A., Lindequist, U., Nawwar, M. A. M. (2003) Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*. *Phytochemistry*, 64:883-889.

Jham, B. C., França, E. C., Oliveira, R. R., Santos, V. R., Kowalski, L. P., Freire, A. R. S. (2007) *Candida* oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: A pilot study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 103:355-358.

Joly, A. B. (1991) *Botânica - Introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 777p.

Katirae, F; Khosravi, A. R; Khalaj, V; Hajiabdolbaghi, M; Khaksar, A; Rasoolinejad, M; Yekaninejad, M. S. (2010) Oropharyngeal candidiasis and oral yeast colonization in Iranian Human Immunodeficiency Virus positive. *Journal of Mycologie Medicale* 20:8-14.

Kawashima, M. (2003) Real time interaction of oral Streptococci with salivary components. *Oral Microbiology and Immunology*, 18:220-225.

Kazor, C. E; Mitchell, P. M; Lee, A. M; Stokes, L. N; Loesche, W. J; Dewhirst, F. E; Paster, B. J. (2003) Diversity of Bacterial Populations on the Tongue Dorsa of Patients With Halitosis Patients. *Journal of Clinical Microbiological*, 41:558-563.

Khan, M. R; Mutasa, S. L; Ndaalio, G; Wevers, H. (1978) Antibiotic action of constituents of the roots of *Euclea natalensis* A.DC. *Pakistan Journal of Science and Industrial Research* 21:197-199.

Kiffer, C; Hsiung, A; Oplustil, C. (2005) Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 9: 216-224.

Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A. (1999) Effects of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Research*, 33:393-400.

Krasse, B. O. (1988) *Risco de Cáries*. 2ª Ed. São Paulo: Editora Quintessence, 113p.

Lacaz, C. S., Minani, P. S., Purchio, A. (1970) *O grande mundo dos fungos*. São Paulo: Polígono, Editora da Universidade de São Paulo, 248p.

Landman, D; Bratu, S; Kochar, S. (2007) Evolution and antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 60:78-82.

Li, X. Z; Zhang, L; Poole, K. (2000) Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 45: 433-436.

Livermore, D. M. (2002) Multiple mechanism of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*; 234: 634-640

Loesche, W. J. (1993) *Cárie dental, uma infecção tratável*. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 349p.

Lorenzi, H., Matos, F. J. A. (2002) *Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas*. São Paulo: Nova Odessa, 512p.

Lorenzi, H., Souza, H. M., Torres, M. A. V., Bacher, L. B. (2003) *Árvores exóticas no Brasil, madeireiras, ornamentais e aromáticas*. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 368p.

Love, R. M. (2001) *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* 34:399-405.

Lynch, D. P. (1994) Memphis, Oral candidiasis: History, classification and clinical presentation. *Oral Medical. Oral Pathology*, 78:189-93.

Macedo, J.A.B. (2000) Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. *Revista Fármacos & Medicamentos* 2:19-24.

Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga, Jr., Grynberg, N. F. (2002) Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25:429-483.

Mah, T. C., O'Toole, G. A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9:34-39.

Mai, A., Rotili, D., Massa, S., Brosch, G., Simonetti, G., Passariello, C., Palamara, A.T. (2007) Discovery of uracyl-based histone deacetylase inhibitors able to reduce acquired antifungal resistance and trailing growth in *Candida albicans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17:1221-1225.

Manica, I. (1981) *Fruticultura Tropical – Manga*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA. 135p.

Maranca, G. (1983) *Fruticultura Comercial, Manga – Abacate*. 5ª Ed. São Paulo: Editora Livraria Nobel, 139p.

Marcotte, H; Lavoie, M.C. (1998) Oral Microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology of Molecular Biology Review*, 62:71-109.

Marinho, V. A; Pereira, G. M. (1998) Cárie: diagnóstico e plano de tratamento. *Revista da Universidade de Alfenas*; 4:27-37.

Marsh, P.; Martin, M. (1992) *Oral Microbiology*. 3ª Ed. London: Chapman e Hall. 200p.

Marta, S.R. (2002) *Avaliação in situ do efeito de dentifrícios com e sem flúor associados ou não à profilaxia profissional com jato de bicarbonato de sódio sobre a remineralização do esmalte dentário*. 139f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru.

Martins, E. R., Castro, D. M., Castellani, D. C., Dias, J. E. (2000) *Plantas Mediciniais*. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 220p.

Martins, L. R. R., Mourão, K. S. M., Albiera, A. L. M., Cortez, D. A. G., Filho, B. P. D., Nakamura, C. V. (2006) Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl). Kuntze (Asteraceae - Heliantheae). *Brazilian Journal of Pharmacognosis*, 16:42-52.

Matos, F. J. A. (1997) *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2ª Ed. Fortaleza: Edições Universidade Federal do Ceará, 141p.

Mattos, B. S. C; Souza, A. A; Magalhães, M. A. C. G; André, M; dias, R. B. (2009) *Candida albicans* in patients with Oronasal Communication and Obturator Prostheses. *Brazilian Dental Journal*, 20:336-340.

Mc Gowan, JE Jr. (2006) Resistance in no fermenting gram negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *American Journal of Infections Control*; 34: (Suppl 1):S29-S37.

Melo, A. F. M; Santos, E. J. V; Souza, L. F. C; Carvalho, A. A. T; Pereira, M. S. V; Higino, J. S. (2006) Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16:202-205.

Menaker, L. (1984) *Cáries Dentárias, Bases Biológicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 461p.

Meng, J; Doyle, M. (2002) Introduction: microbial food safety. *Microbes Infections*, 4:395-397.

Merrit, J; Qi, F; Goodman, S. D; Anderson, M. H; Shi, W. (2003) Mutation of luxS Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 71:1972-1979.

Michelin, D. C., Moreschi, P. E., Lima, A. C., Nascimento, G. G. F., Paganelli, M. O., Chaud, M. V. (2005) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15:316-320.

Minagi, S; Miyake, Y; Inagaki, K; Tsuru, H; Suginaka, H. (1985) Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infectology and Immunology*, 47:11-14.

Moalic, E; Gestalin, A; Quinio, D; Gest, P. E; Zerilli, A; Le Flohic, A. M. (2001) The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Research*, 35:149-155.

More, G; Tshikalange, T. E; Lall, N; Meyer, J. J. M (2008) Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 119:473-477.

Moreira, G. R; Caliman, F. R. B; Silva, D. J. H; Ribeiro, C. S. C. (2006) Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário*, 27:16-29.

Moreira, M; Vicente, V. A; Glienke, Chirlei (2007) Genetic Variability of *Streptococcus mutans* Isolated From Low-Income Families, As Show By Rapid Markers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38:729-735.

Moreira, R. C. R., Rebelo, J. M. M., Gama, M. E. A., Costa, J. M. L. (2002) Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão. *Caderno de Saúde Pública*, 18:187-195.

Murata, R. M. (2004) *Avaliação in vitro do efeito de Kaempferol e t-farnesol sobre o biofilme dental – inibição e viabilidade bacteriana*. Dissertação (Mestrado – área de concentração em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica)- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. 38p.

Nakano, K; Nomura, R; Ooshima, T (2008) *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. *Japanese Dental Science Review*, 44:29-37.

Neufeld, P. M. (1999) *Manual de Micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico*. Rio de Janeiro. Programa Nacional de Controle de Qualidade. 89p.

Newbrun, E. (1988) *Cariologia*. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 326p.

Newman, M. G., Nisengard, R. L. (1994) *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 395p.

Nicastro, G. G; Boechat, A. L; Abe, C. M; Kaihami, G. H; Baldini, R. L. (2009) PA *cupD* transcription is activated by the RcsB response regulator, but repressed by its putative cognate sensor RcsC. *FEMS Microbiology Letters*, 301:115-123.

Nicoletti, G; Schito, G; Fadda, G. (2006) Bacterial isolates from severe infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a nationwide study in the hospital setting. *Journal of Chemotherapy*; 18:589-602.

Odds, F. C. (2002) *Candida and candidosis*. In: Suci P. A., Tyler, B. J. Action of Chlorhexidine against Yeast and Filamentous Forms in an Early-Stage *Candida albicans* Biofilm, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Balliere Tindall, London, England. 301p.

Oliveira, R. A. G; Lima, I. O; Souza, E. L; Vieira, W. L; Freire, K. R. L; Trajano, V. N; Lima, I. O; Silva-Filho, R. N. (2007) Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungal. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17:186-190.

Pack, Y. K; Koo, H; Abreu, J. A. S; Ikegaki, M; Cury, J. A; Rosalen, P. L. (1998) Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*, 36:24-28.

Panizza, S. (1997) *Plantas que curam*. 24^a Ed. São Paulo: Editora Ibrasa, 279p.

Paradella, T. C; Koga-Ito, C. Y.; Jorge, A. O. C. (2007) *Enterococcus faecalis*: Considerações clínicas e microbiológicas. *Revista de Odontologia da UNESP*; 36:163-68

Parini, M. R; Pitt, W. G. (2006) Dynamic removal of oral biofilms by bubbles. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces* 52:39-46.

Payne, R. J; Phil, D; Jansen, V. A. (2000) Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 68:225-230.

Pellegrino, F. L; Teixeira, L. M; Carvalho, M. G. (2002) Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Clinical Microbiology*, 40:2420-2424.

Pepato, M. T. (2001) Lack of antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 34:389-395.

Pinheiro, M. L. P; Andrade, E. D. (2008) Fitoterapia como alternativa ao uso de medicamentos convencionais em odontologia. *Revista da ABO Nacional*, 19:1

Pinto, C. M. F; Puiatti, M; Caliman, F. R. B; Moreira, G. R; Mattos, R. N. (2006) Clima, época de semeadura, produção de mudas, plantio e espaçamento na cultura da pimenta. *Informe Agropecuário*, 27:40-49.

Pinto, U. M; Cardoso, R. R; Vanetti, M. C. D. (2004) Detecção de *Listeria* e *Klebsiella* em serviço de alimentação food service. *Revista de Nutrição*, 171-177.

Prithiviraj, B; Bais, H; Weir, T; Suresh, B; Najarro, E; Dayakar, B; Schweizer, H; Vivanco, J. (2005) Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infectious Immunology*, 73:5319-5328

Raja, N. S; Singh, N. N. (2007) Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Journal of Microbiology and Immunology Infections*; 40:45-49.

Ramos, I. N. C., Vasconcelos, L. C. S., Lima, M. G. G. C., Figueiredo, R. L. Q. (1999) Candidose bucal em pacientes HIV-positivos. *Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia*, 3:59-61.

Reifschneider, F. J. B. (2000) *Capsicum Pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia Embrapa Hortaliças, 113p.

Rogers, A. H. (1976) Bacteriocinogeny and properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. *Archive of Oral Biology*. 21: 99-104.

Rosebury, T. (1962) *Microorganisms Indigenous to Man*. York: The Maple Press Company, p. 435.

Rozen, R; Bacharach, G; Bronshteyn, M; Steinberg, D. (2001) The role of Fructans on Dental Biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiology Letters*, 195: 205-210.

Sader, H. S; Gales, A. C; Pfaller, M. A. (2001) Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 5: 200-214.

Safdar, N; Handelsman, J; Maki, D. G. (2004) Does combination antimicrobial therapy reduces mortality in Gram-negative bacteremia analysis. *Lancet Infectious Diseases*; 4:519-527.

Samaranayake, L. P; MacFarlane, T. W. (1997) An *in vitro* study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archive of Oral Biology*, 25:603-673.

Samie, A; Obi, C. L; Bessong, P. O; Namrita, L (2005) Activity profile of fourteen selected medicinal plants from rural Venda community in South Africa against fifteen clinical bacterial species. *African Journal of Biotechnology*, 4:1443-1451.

Santos, E. B; Schwartz Filho, H. O; Schwartz, E. A; Ramos Jr., E. (2002) Perfil da Saúde bucal de pacientes Atendidos nas Clínicas Odontológicas da UEPÁG. UEPG- *Biological and Health Sciences*, 8:57-73.

Segatto, F. B. (2007) *Avaliação Da Qualidade “Pós Produção” De Pimenta Ornamental*. Tese de Doutorado- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 88p.

Seki, M; Yamashita, Y; Shiata, H; Torigoe, H; Tsuda, H; Maeno, M. (2006) Effect of mixed mutans Streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiology and Immunology*, 21:47-52.

Shidhar, S. B; Sheetal, U. D; Pai, M. R. S. M; Shastri, M. S (2005) Preclinical evaluation of the antiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed Power in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 48:436-468.

Shimada, M. H; Angels, L; Ciesielsky, F. I. N; Jardim, E. C. G; Jardim Jr., E. G. (2008) Emprego de saliva na determinação do risco ás doenças periodontais: aspectos microbiológicos e clínicos. *Revista de Odontologia da UNESP*, 37:183-189.

Shuford, J. A., Piper, K. E., Steckelberg, J. M., Patel, R. (2007) *In vitro* biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57:277-281.

Silva, F., Casali, V.W.D. (2000) Plantas Medicinais e Aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais. Viçosa: UFV, 135p.

Silva Jr., J. O. C., Vieira, J. L. F., Barbosa, W. L. R., Pereira, N. L. (2006) Caracterização físico-química do fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, (supl.16):671-677.

Silva, C. V; Bilia D. A. C; Maluf, A. M; Barbedo, C. J. (2005) Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess- Myrtaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 26:213-221.

Silva, J. G; Souza, I. A; Higino, J. S; Siqueira-Júnior, J. P; Pereira, J. V. Pereira, M. S. V. (2007) Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. Em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17:572-577.

Silva, M. I. G (2003) *Utilização de fitoterápicos nas Unidades Básicas de Saúde da Família (UBSF) no Município de Maracanaú-CE. Fortaleza*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará. 144p.

Silva, M. L., Cechinel Filho, V. (2002) Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, 25:449-454.

Simão, S. (1998) *Tratado de Fruticultura*. São Paulo: Ed. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queirós, 760p.

Siqueira, J. B; Builge, H. S. (2004) Fungi in endodontic infections. *Oral Medical. Oral pathological. Oral Radiology. Endodontic*, 97:632-41.

Soares, S. P; Vinholis, A. H. C; Casemiro, L. A; Silva, M. L. A; Cunha, W. R; Martins, C. H. G. (2008) Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. *Revista Odonto Ciência*, 23:141-144.

Souza, V. C., Lorenzi, H. (2005) *Botânica Sistemática*. São Paulo: Nova Odessa, 634p.

Spratt, D. A., Pratten, J. (2003) Biofilms and the oral cavity. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2:109-120.

Stehmann, J. R. & Mentz, L. A. (2006) *Riqueza e endemismo de Solanaceae na Região Sul do Brasil*. In: Mariath, J.E.A. & Santos, R.P. (orgs). Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia e genética. Porto Alegre, *Sociedade Botânica do Brasil*. p. 190-193.

Suci, P. A., Tyler, B. J. (2002) Action of Chlorhexidine Digluconate against Yeast and Filamentous Forms in Early- Stage *Candida albicans* Biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3522-3531.

Takahashi, N. (2005) Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress of Amsterdam*, 284:103-12.

Tamura, N. K. (2003) Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. *Mycopathologia*, 156:269-272.

Thein, Z.M., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P. (2006) Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans*. *Archives of Oral Biology*, 51: 672-680.

Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., Samaranayake, L. P. (2007) *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non - *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, 52:761-767.

Thurnheer, T; Gmu, R; Guggenheim, B. (2004) Multiplex Fish analysis of a six-species bacterial biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 56:37-47.

Thylstrup, A., Fejerskov, O. (1988) *Tratado de Cariologia*. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 388p.

Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Gompertz, O. F., Candeias, J. A. N. (1999) *Microbiologia*. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 586p.

Trabulsi, L. R., Alterthum, F., Gopertz, O. F., Candeias, J. A. N. (1993) *Microbiologia*. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 586p.

Uzeda, M. (2002) *Microbiologia Oral*. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica LTDA. 104p.

Veiga Jr., V. F.; Pinto, A. C. (2005) Plantas Medicinais: Cura Segura? *Química Nova*, 28:519-528.

Vendruscolo, G. S., Rates, S. M. K., Mentz, L. A. (2005) Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15:361-372.

Vidigal, D. S. (2008) *Alterações Fisiológicas e Bioquímicas em Sementes de Pimenta em Função do Estádio de Maturação dos Frutos*. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 77p.

Vieira, N; Csal, M; Johansson, B; MacCallum, D. M; Brwon, A. J. P; Paiva, S. (2010) Functional specialization and differential regulation of short-chain carboxylic acid transports in the pathogen *Candida albicans*. *Journal of Molecular Microbiology*, 75:1337-1354.

Virtuoso, S; Davet, A; Dias, F. G; Miguel, M. D; Oliveira, A. B; Miguel, O. G. (2008) Atividade antibacteriana de *Cereus Jamacaru* DC, Cactaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19:561-564.

Vitse, A. S; Boualem, S; Joossens, M; François, N; El Khoury, P. V; Broly, F; Rutgeerts, P; Vermeire, S.(2009) *Candida albicans* colonization and ASCA in Familial Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, 104:1745-1753.

Wagner, Caroline Moor.(2003) *Variabilidade e Base Genética da Pungência e de Caracteres do Fruto: Implicações no Melhoramento de uma População de Capsicum annum L.* Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, SP. 104p.

Watenick, P & Kolter R. (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182: 2675-2679.

Wilson, M. (2004) Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy or oral infections. *Photochemistry and Photobiology*, 3:412-418.

Xavier, F; Vijayalakshmi, P. (2007) Screening of Antibiotic Resistant Inhibitors from Indian traditional Medicinal Plants against *Streptococcus mutans*. *Journal of Plant Sciences* 2: 370-373.

Yoshida, A; Ansai, T; Takehara, T; Kuramitsu, H. K. (2004) LuxS – Based signaling Affects *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:2372-2380.

Yussef, M; Shurman, A; Bougnoux, M. E.; Rawasheded, M; Breatagne, S; Strockbine, N. (2000) Bacterial, viral and parasitic enteric pathogens associated with acute diarrhea in hospitalized children from northern Jordan. *FEMS Immunology Medical and Microbiology*, 28:257-263.